

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-231785

(43) 公開日 平成7年(1995)9月5日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	片内整理記号	P I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/04	E	8828-4B		
1/21				
15/00	Z N A	8821-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A

審査請求 未請求 審査請求の徴15 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-181308

(22) 出願日 平成5年(1994)8月2日

(31) 優先権主張番号 特願平5-281649

(32) 優先日 平5(1993)9月24日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平5-337191

(32) 優先日 平5(1993)12月28日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002901

ダイセル化学工業株式会社

大阪府堺市東区1番地

(72) 発明者 小島 智子

茨城県つくば市梅園2-3-11

(72) 発明者 山本 浩明

茨城県つくば市千現1-14-14-103

(72) 発明者 河田 直紀

茨城県つくば市千現1-14-14-304

(72) 発明者 松山 彰敏

新潟県新潟市中川125-1-104

(71) 代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

(54) 【発明の名称】 新規な酵素、該酵素を製造する方法、該酵素をコードするDNA、該DNAを含む形質転換体、  
該酵素による光学活性アルコール等の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 光学活性アルコール等の合成に有用な新規な2級アルコール脱水素酵素及び該酵素をコードするDNAを提供する。

【構成】 キャンディタ属に属する微生物が立体選択性の高い、新規な2級アルコール脱水素酵素を生成することを同定した。また、該酵素を利用して、光学活性アルコール等を製造した。また、該酵素をコードするDNAをクローニングし、その塩基配列を明らかにした。

【効果】 新規な立体選択性の高い2級アルコール脱水素酵素、該酵素をコードする遺伝子を提供したことによって、光学活性アルコール等の効率的な製造が可能になった。

(2)

特開平7-231785

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の①から④に示す塩化学的性質を有する酵素。

①作用

NAD<sup>+</sup>（酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）を補酵素として、アルコールを酸化し、ケトン又はアルデヒドを生成する。また、NADH（還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）を補酵素として、ケトン又はアルデヒドを還元し、アルコールを生成する。

②基質特異性

芳香族置換を含む脂肪族アルコールを酸化反応の基質とする。1級アルコールに比較して2級アルコールに対して活性が高い。2-ブタノールのS体を優先的に酸化する。アルデヒド又は芳香族置換を含む脂肪族ケトンを還元反応の基質とする。

③分子量

SDS-PAGEで測定した場合、約4万。

【請求項2】 キャンディダ(*Candida*) 属に属し請求項1の酵素を産生する微生物を培養し、培養物から該酵素を取得することを特徴とする、請求項1記載の酵素の製造方法。

【請求項3】 請求項2記載の方法において、キャンディダ属に属する微生物が、キャンディダ・パラブシロシス(*Candida parapsilosis*)であることを特徴とする方法。

【請求項4】 請求項1記載の酵素をコードするDNA。

【請求項5】 請求項4記載のDNAにおいて、アミノ酸配列が実質的に図6、7、8に示されている蛋白質をコードする塩基配列を含むことを特徴とするDNA。

【請求項6】 請求項5記載のDNAにおいて、アミノ酸配列が図6、7、8に示されている蛋白質をコードする塩基配列を含むことを特徴とするDNA。

【請求項7】 請求項5記載のDNAにおいて、アミノ酸配列が図6、7、8に示されている配列を置換、挿入又は欠失したものである蛋白質をコードする塩基配列を含むことを特徴とするDNA。

【請求項8】 請求項4～7のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

【請求項9】 請求項4～7のいずれかに記載のDNAによって形質転換された微生物。

【請求項10】 請求項9に記載の微生物を培養し、培養物から請求項1記載の酵素を取得することを特徴とする、請求項1記載の酵素の製造方法。

【請求項11】 請求項1に記載の酵素、又は該酵素を産生する微生物もしくはその処理物を、ケトン又はアルデヒドに作用させ、該ケトン又はアルデヒドを還元してアルコールを製造することを特徴とする、アルコールの製造方法。

【請求項12】 請求項1に記載の酵素、又は該酵素を

2

産生する微生物もしくはその処理物を、非対称ケトンに作用させ、該非対称ケトンを還元して光学活性アルコールを製造することを特徴とする、光学活性アルコールの製造方法。

【請求項13】 請求項1に記載の酵素、又は該酵素を産生する微生物もしくはその処理物をアルコールに作用させ、該アルコールを酸化してケトン又はアルデヒドを製造することを特徴とする、ケトン又はアルデヒドの製造方法。

10 【請求項14】 請求項1に記載の酵素、又は該酵素を産生する微生物もしくはその処理物をラセミ体アルコールに作用させ、光学異性体の一方を優先的に酸化し、残存する光学活性アルコールを取得することを特徴とする、光学活性アルコールの製造方法。

【請求項15】 請求項9に記載の微生物由来の酵素、又は請求項9に記載の微生物もしくはその処理物を作用させることを特徴とする請求項11～14のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アルコール、アルデヒド、ケトンの製造、特に光学活性アルコールの製造に有用な新規な2級アルコール脱水素酵素、該酵素の製造方法、該酵素をコードするDNA、該DNAにより形質転換された微生物、及び該酵素を用いてアルコール、アルデヒド、ケトン、特に光学活性アルコールを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 微生物が産生する2級アルコール脱水素酵素としては、補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸（以下、NADP<sup>+</sup>と略す）を要求するサーモアナエロビウム・ブロッキー (*Thermoaerobium brockii*) 由来のアルコール脱水素酵素 (J. Am. Chem. Soc. 108, 162-169 (1986)) が知られている。また、補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下、NAD<sup>+</sup>と略す）を要求する2級アルコール脱水素酵素としては、ピキア・エスビー NRRL-Y-11328 (*Pichia* sp. NRRL-Y-11328; Eur. J. Biochem. 101, 401-406 (1979))、シュードモナス・エスビー SPDS (*Pseudomonas* sp. SPDS; Bioorg. Chem. 19, 398-417 (1991))、シュードモナス・フルオレッセンズ NRRL B-1244 (*Pseudomonas fluorescens* NRRL B-1244; 特開昭59-17982号)、シュードモナス・マルトフィラ MB111 (*Pseudomonas maltophilia* MB111; FEMS Microbiol. Lett. 9, 3, 49-56 (1992))、シュードモナス・エスビー FED (*Pseudomonas* sp. FED; J. Org. Chem. 57, 1526-1532 (1992))、シュードモナス・エスビー ATCC 21439 (*Pseudomonas* sp. ATCC 21439; Eur. J. Biochem. 119, 359-364 (1981))、キャンディダ・ボイディニイ SAMH (*Candida boidinii* SAMH; Biochim. Biophys. Acta 716, 298-307

50

(3)

特開平7-231785

3

(1992)）、ミコバクテリウム・バカエ JOB-5 (*Mycobacterium vaccae* JOB-5; J. Gen. Microbiol., 131, 2971-2977 (1985))、ロドコッカス・ロドクロウス RNC1 (*Rhodococcus rhodochrous* RNC1; Arch. Microbiol., 153, 163-168 (1990))、コマモナス・テリゲナ (*Corynebacterium terrigena*; Biochem. Biophys. Acta 651, 74-86 (1981))、アースロバクター・エスピー SBA (*Arthrobacter* sp. SBA; 特開昭51-57882号)由来の酵素が報告されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの2級アルコール脱水素酵素の立体選択性は満足できるものではない。例えば、2級アルコール脱水素酵素の基質として最も報告の多い2-ブタノールに対して、

(S)-2-ブタノールを立体選択的に酸化し、2-ブタノンを生産する活性を有する酵素は知られていない

(シュードモナス・エスピー ATCC 21439、シュードモナス・エスピー SP06、コマモナス・テリゲナ、キャンディダ・ボイディニイ SA44又はヒキア・エスピー NRRL Y-11328が産生する酵素においてはR体が優先的に酸化され、シュードモナス・フルオレッセンシ NRRL B-1244が産生する酵素においては立体選択性を示さず、ミコバクテリウム・バカエ JOB-5、ロドコッカス・ロドクロウス RNC1、シュードモナス・エスピー PED又はシュードモナス・マルトフィラ NR111が産生する酵素においてはその立体選択性は記載されていない)。なお、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の1級アルコール脱水素酵素 (SADH I) は、2-ブタノールに関してはS体を優先的に酸化するという報告があるが (Arch. Biochem. Biophys., 125, 933-944 (1968)、J. Biol. Chem., 268, 7792-7798 (1993))、その相対活性はエタノールの1%程度と極めて低く、到底実用に耐えられるものではない。

【0004】即ち、(S)-2-ブタノールを優先的に酸化する2級アルコール脱水素酵素はこれまで知られておらず、立体選択性の高い2級アルコール脱水素酵素を見出すことが強く望まれていた。

【0005】また、該酵素の遺伝子をクローニングできれば、遺伝子工学の手法を用いて該酵素を大量に製造することが可能となるので、該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることが強く望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、(S)-2-ブタノールを優先的に酸化する能力を有する微生物を広くスクリーニングし、キャンディダ属に属する微生物、特にキャンディダ・パラブシロシス (*Candida parapsilosis*) が (S)-2-ブタノールを優先的に酸化する能力を有することを見いだした。更に、この微生物を培養し、その菌体より (S)-2-ブタノールを酸化する酵素を精製した。そして、その性質を検討した結果、該酵素が (S)-2-ブタノールを高い立体選択性を持

4

って酸化すること、更に (S)-2-ブタノール以外の多くの2級アルコールを立体選択的に酸化することを見いだした。

【0007】即ち、本発明は、次の①から④に示す理化学的性質を有する酵素を提供する。

①作用

NAD<sup>+</sup> を補酵素として、アルコールを酸化し、ケトン又はアルデヒドを生成する。また、NADHを補酵素として、ケトン又はアルデヒドを還元し、アルコールを生成する。

【0008】②基質特異性

芳香族置換を含む脂肪族アルコールを酸化反応の基質とする。1級アルコールに比較して2級アルコールに対して活性が高い。2-ブタノールのS体を優先的に酸化する。

【0009】アルデヒド又は芳香族置換を含む脂肪族ケトンを還元反応の基質とする。

【0010】③分子量

SDS-PAGEで測定した場合、約4万。なお、本発明の酵素の上記以外の理化学的性質、及び酵素学的性質は以下の通りである。

【0011】④至適pH及び安定pH範囲

(S)-2-ブタノール酸化反応の至適pHは8.5～9.5である。2-ブタノン還元反応の至適pHは5.5～6.5である。

【0012】pH8.0～10.0で比較的安定である。

【0013】⑤作用温度の範囲

25～55℃で活性が高く、50℃が至適温度である。

【0014】⑥温度による失活の条件

40℃10分間の熱処理後でも90%以上の残存活性を有する。

【0015】⑦阻害及び安定化

パラヒドロキノン安息香酸、塩化水銀、塩化銅、塩化亜鉛、N-エチルマレイミドなどのSH試薬で阻害される。還元剤の2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールで阻害され、o-フェナントリンで阻害されるが、エチレンジアミン4酢酸では阻害されない。

【0016】⑧精製方法

通常のタンパク質の精製方法を適当に組み合わせることにより精製することができる。例えば、菌体を破砕後、プロタミン硫酸沈殿を行い、その遠心分離上清を硫酸アンモニウムを用いて塩析し、更に、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過を組み合わせることにより、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGEと略す）で単一バンドになるまで精製することができる。

【0017】⑨等電点

等電点電気泳動に於いていくつかのバンドを生成する

10

20

30

40

50

(4)

特開平7-231785

5

が、主要なバンドの等電点は、6.7であった。

【0018】なお、本明細書中の実施例を含む全ての2級アルコール脱水素酵素活性の測定は、以下に示す方法により行った。即ち、トリス-塩酸緩衝液(pH9.0) 50  $\mu\text{mol}$ 、 $\text{NAD}^+$  2.5  $\mu\text{mol}$ 、(S)-2-ブタノール 50  $\mu\text{mol}$  及び酵素を含む反応液中30℃で反応させ、 $\text{NADH}$ の生成に由来する340nmの吸光度の増大を測定した。1Uは、1分間に1 $\mu\text{mol}$ の $\text{NADH}$ の生成を触媒する酵素量とした。

【0019】また、本発明は、2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAを提供する。即ち、本発明者は、精製した2級アルコール脱水素酵素をリゾルエンデペプチダーゼにより消化し、逆相HPLCにより切断された断片を精製後、プロテインシーケンサーによりアミノ酸配列の一部を決定した。得られたアミノ酸配列をもとにして、PCR(Polymerase Chain Reaction)用プライマーを合成し、キャンディダ・パラブシロシス(*Candida parapsilosis*)の染色体DNAを鋳型としたPCRを行い、2級アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子の一部を増幅した。その塩基配列(コア配列)を明らかにした。更に、得られたDNA配列(コア配列)の周辺領域の塩基配列を明らかにするために、キャンディダ・パラブシロシス(*Candida parapsilosis*)の染色体DNAをコア配列中にその塩基配列が存在しない制限酵素 *Hae* II により消化し、生成したDNA断片をT4リガーゼにより自己消化し、逆PCR(Nucleic Acids Res. 16, 8185 (1988))用の鋳型DNAを調製した。次に、コア配列をもとに、コア配列の外側に向かうDNA合成の開始点となるプライマーを合成し、逆PCRによりコア配列の周辺領域を増幅した。得られたDNAの塩基配列を明らかにした結果、自己消化したDNA中に、図6、7、8に示す2級アルコール脱水素酵素の全コード領域が含まれていることを確認した。更に、クローニングした遺伝子の大腸菌宿主中での発現産物が、キャンディダ・パラブシロシス由来の2級アルコール脱水素酵素と同様の活性を有することを確認した。

【0020】本発明の、2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAは、2級アルコール脱水素酵素の活性を有して、アミノ酸配列が実質的に図6、7、8に示されている蛋白質をコードする塩基配列を含むことを特徴とする。ここで「実質的」とは、2級アルコール脱水素酵素の活性を有する限り、図6、7、8に示したアミノ酸配列についてアミノ酸のいくつかの欠失、挿入、置換等があってもよいことを示すものである。本発明のDNAには、図6、7、8に示した1008塩基からなるDNAが含まれることはいうまでもないが、本発明はこれに限られるものではない。なお、DNAがコードするアミノ酸配列についてアミノ酸のいくつかの欠失、挿入、置換等を生じるようにDNAを改変することは、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入法

5

など、周知の方法で適宜行うことができる。また、図6、7、8に示した1008塩基を含むDNAまたは該DNAを適宜改変したDNAを鋳型にして、PCR法を $\text{Mn}^{2+}$ イオンの存在下(通常0.5~10mMの濃度)または特定のヌクレオチドの濃度を低くして行うことによって、ランダムに変異が導入されたDNAを得ることができる。このようにして得られたDNAのうち、2級アルコール脱水素酵素の活性を有するタンパク質をコードするものが、本発明に含まれることはいうまでもない。

【0021】更に本発明は、アミノ酸配列が実質的に図6、7、8に示されている蛋白質をコードするDNAにより形質転換された、2級アルコール脱水素酵素生産菌を有する微生物を提供する。

【0022】本発明において形質転換の対象となる微生物は、2級アルコール脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAにより形質転換され、2級アルコール脱水素酵素活性を発現することができる微生物であればいかなるものでもよく、具体的には、イシエリヒア(*Escherichia*)属、バチルス(*Bacillus*)属、シュドモナス(*Pseudomonas*)属、セラチア(*Serratia*)属、ブレヴィバクテリウム(*Brevibacterium*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属など宿主、ベクター系の開発されている細菌、サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属、クライベロマイセス(*Kluyveromyces*)属、シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属、チゴサッカロマイセス属(*Zygosaccharomyces*)属、ヤロウイア(*Yarrowia*)属、トリコスボロン(*Trichosporon*)属、ロドスポリジウム(*Rhodospiridium*)属、ハンゼヌラ(*Hansenula*)属、ヒキア(*Pichia*)属、キャンディダ(*Candida*)属などの酵母、ノイロスボラ(*Neurospora*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、セファロスポリウム(*Cephalosporium*)属、トリコデルマ(*Trichoderma*)属などに属するカビなどが含まれる。

【0023】形質転換体の作製のための手順ないし、方法そのものは、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において使用されている技術に依拠して行うことができる。

【0024】微生物中において、本発明の遺伝子を発現させるためには、まず微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中にこの遺伝子を挿入する必要がある。また、本発明のDNAを微生物中で発現させるためには、それが有する遺伝情報を転写・翻訳させる必要がある。そのためには、転写・翻訳を制御するユニットにあたるプロモーターを本発明のDNAの5'-側上流に、ターミネーターを3'-側下流に、それぞれ組み込めばよい。このプロモーター、ターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター、ターミネータ

50

(5)

特開平7-231785

7

ーを用いる必要がある。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターなどに関して「微生物学基礎講座8遺伝子工学・共立出版」、特に酵母に関しては「Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990)」又は「Yeast 8, 423-483 (1992)」などに詳細に記述されている。

【0025】例えば、インシュリシア属特に大腸菌イシエリヒア・コリ(Escherichia coli)においては、プラスミドベクターとして、 $\rho$ SR、 $\rho$ LC 系プラスミドを利用することが可能であり、 $\text{lac}(\beta$ -ガラクトシダーゼ)、 $\text{trp}(\text{トリプトファンオペロン})$ 、 $\text{tac}(\text{tac, trp の融合})$ 、 $\lambda$ ファージ PL、PR などに由来するプロモーターなどが利用できる。また、ターミネーターとしては、 $\text{trpA}$  由来、ファージ由来、 $\text{rml}$ リボソームアルターミネーターなどを用いることができる。

【0026】バチルス属においては、ベクターとして  $\text{pU110}$  系プラスミド、 $\text{pC194}$  系プラスミドなどが利用可能であり、染色体に直接挿入させることもできる。また、プロモーター、ターミネーターとして  $\text{apr}(\text{アルカリプロテアーゼ})$ 、 $\text{npr}(\text{中性プロテアーゼ})$ 、 $\text{amy}(\text{α-アミラーゼ})$  などが利用できる。

【0027】シュードモナス属においては、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、シュードモナス・セパシア(Pseudomonas cepacia) などで宿主ベクター系が開発されており、トルエン化合物の分解に関与するプラスミド  $\text{TOL}$  プラスミドを基本にした広宿主域ベクター(RSP1010)などに由来する自律的複製に必要な遺伝子を含む  $\text{pKT240}$  などが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとして、リパーゼ遺伝子(特開平5-284973号)などが利用できる。

【0028】ブレヴィバクテリウム属、特にブレヴィバクテリウム・ラクトファermenタム(Brevibacterium lactofermentum)においては、 $\text{pAJ43}$  (Gene 39, 281 (1985)) などのプラスミドベクターが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとしては、大腸菌で使用されているプロモーター、ターミネーターがそのまま利用可能である。

【0029】コリネバクテリウム属、特にコリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)においては、 $\text{pCS11}$  (特開昭57-183799号)、 $\text{pCB101}$  (NO 1, Gen. Genet. 196, 175 (1984)) などのプラスミドベクターが利用可能である。

【0030】ストレプトコッカス(Streptococcus)属においては、 $\text{pM1301}$  (FEKS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985))、 $\text{pGK1}$  (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)) などがプラスミドベクターとして利用可能である。

【0031】ラクトバチルス(Lactobacillus)属においては、ストレプトコッカス属用に開発された  $\text{pAM21}$  (J. Bacteriol. 137, 614 (1979)) などが利用可能であり、プロモーターとして大腸菌で利用されているもの

8

が利用可能である。

【0032】サッカロマイセス(Saccharomyces)属、特にサッカロマイセス・セレビジアエ(Saccharomyces cerevisiae)においては、 $\text{YRp}$  系、 $\text{YEp}$  系、 $\text{YCP}$  系、 $\text{YIp}$  系プラスミドが利用可能であり、染色体内に多コピー存在するリボソームDNAとの相同組換えを利用したインテグレーションベクター(EP 537456 など)は、多コピーで遺伝子を導入でき、かつ安定に遺伝子を保持できるため極めて有用である。また、 $\text{ADH}$ (アルコール脱水素酵素)、 $\text{CAP51}$ (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)、 $\text{PHO}$ (酸性フォスファターゼ)、 $\text{GAL}(\beta$ -ガラクトシダーゼ)、 $\text{PGK}$ (ホスホグリセレートキナーゼ)、 $\text{ENO}$ (エノラーゼ)などのプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【0033】クライベロマイセス属、特にクライベロマイセス・ラクティス(Kluyveromyces fragilis)においては、サッカロマイセス・セレビジアエ由来  $\text{2}\mu\text{m}$  系プラスミド、 $\text{pKOL}$  系プラスミド(J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981))、キラー活性に関与する  $\text{pK71}$  由来プラスミド、クライベロマイセス属における自律増殖遺伝子  $\text{KARS}$  系プラスミド、リボソームDNAなどとの相同組換えにより染色体中にインテグレート可能なベクタープラスミド(EP 537456 など)などが利用可能である。また、 $\text{ADH}$ 、 $\text{PGK}$  などに由来するプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【0034】シゾサッカロマイセス(Schizosaccharomyces)属においては、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来の  $\text{ARS}$ (自律複製に関与する遺伝子)及びサッカロマイセス・セレビジアエ由来の栄養要求性を排除する選択マーカーを含むプラスミドベクターが利用可能である(Mo 1, Cell Biol. 5, 80 (1986))。また、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来の  $\text{ADH}$  プロモーターなどが利用できる(EMBO J. 5, 729 (1987))。

【0035】チゴサッカロマイセス属(Zygosaccharomyces)においては、チゴサッカロマイセス・ロウキン(Zygosaccharomyces rouxii)由来の  $\text{pSB3}$  (Nucleic Acids Res. 13, 4267 (1985)) などに由来するプラスミドベクターが利用可能であり、サッカロマイセス・セレビシエ由来  $\text{PHO5}$  プロモーターや、チゴサッカロマイセス・ロウキン由来  $\text{CAP-21}$ (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)のプロモーター(Aqm. Biol. Chem. 54, 2521 (1990))などが利用可能である。

【0036】ハンゼヌラ(Hansenula)属においては、ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)において宿主ベクター系が開発されている。ベクターとしては、ハンゼヌラ・ポリモルファ由来自律複製に関与する遺伝子( $\text{HARS1}$ ,  $\text{HARS2}$ )も利用可能であるが、比較的不安定であるため、染色体への多コピーインテグレーションが有効である(Yeast 7, 431-443 (1991))。また、メタノールなどで誘導される  $\text{AOX}$ (アルコールオキシダ

50

(6)

特開平7-231785

9

一ゼ), FDH( 乳酸脱水素酵素) のプロモーターなどが利用可能である。

【0037】ピキア(*Pichia*)属においては、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などにピキア由来自律複製に関与する遺伝子(PARS1, PARS2)などを利用した宿主ベクター系が開発されており(Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985)), 高濃度培養とメタノールで誘導可能な AOX など強いプロモーターが利用できる(Nucleic Acids Res. 13, 3353 (1987))。

【0038】キャンディダ(*Candida*)属においては、キャンディダ・マルトウサ(*Candida maltosa*)、キャンディダ・アルビカンズ(*Candida albicans*)、キャンディダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*)などにおいて宿主ベクター系が開発されている。キャンディダ・マルトウサにおいてはキャンディダ・マルトウサ由来ARSがクロニングされ(Agr. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987)), これを利用したベクターが開発されている。

【0039】アスペルギルス(*Aspergillus*)属においては、カビの中で最もよく研究されており、プラスミドや染色体へのインテグレーションが利用可能であり、菌体外プロテアーゼやアミラーゼ由来のプロモーターが利用可能である(Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989))。

【0040】トリコデルマ(*Trichoderma*)属においては、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)を利用した宿主ベクター系が開発され、菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーターなどが利用できる(Biotechnology 7, 595-603 (1989))。

【0041】本発明の酵素は、キャンディダ(*Candida*)属に関する下記①から④に示す性質を有する酵素を産生する微生物もしくはその変異株、又は該酵素をコードする遺伝子を担った微生物宿主に導入し該酵素生産能を付与された遺伝子組換え体を培養することなどにより製造することができる。

【0042】①作用

NAD<sup>+</sup> を補酵素として、アルコールを酸化し、ケトン又はアルデヒドを生成する。また、NADHを補酵素として、ケトン又はアルデヒドを還元し、アルコールを生成する。

【0043】②基質特異性

芳香族置換を含む脂肪族アルコールを酸化反応の基質とする。1級アルコールに比較して2級アルコールに対して活性が高い。2-ブタノールのS体を優先的に酸化する。

【0044】アルデヒド又は芳香族置換を含む脂肪族ケトンを還元反応の基質とする。

【0045】③分子量

SDS-PAGEで測定した場合、約4万。

【0046】更に、本発明の2級アルコール脱水素酵素、又は該酵素を含む微生物(変異株や遺伝子組換え株

10

生物を含む) もしくはその処理物を、芳香族置換されてもよい脂肪族2級アルコール、例えば、2-ブタノール、2-オクタノール、フェニルエタノール、1, 3-ブタンジオール、β-ヒドロキシ-n-酪酸エチルエステルなどのラセミ体アルコールに作用させ、光学活性体の一方(2-ブタノール、2-オクタノール、フェニルエタノール、1, 3-ブタンジオール、β-ヒドロキシ-n-酪酸エチルエステルにおいてはそのS体)のみを酸化することにより、他方の光学活性アルコール(2-ブタノール、2-オクタノール、フェニルエタノール、1, 3-ブタンジオール、β-ヒドロキシ-n-酪酸エチルエステルにおいてはそのR体)を生産することができる。この酸化反応により補酵素NAD<sup>+</sup>は還元され、NADHが生成する。

【0047】生成したNADHは、例えば、微生物の有するNADHをNAD<sup>+</sup>に変換する能力により、NAD<sup>+</sup>に変換(再生)されることができる。また、グルタミン酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素、NADH脱水素酵素、NADHオキシダーゼなどのNADHをNAD<sup>+</sup>に酸化する活性を有する酵素、又はこれら酵素を含有する微生物もしくはその処理物を反応系に添加することにより、NAD<sup>+</sup>を再生することもできる。また、本発明の酵素の基質特異性を利用して、反応系にアセトン、2-ブタノンなどの炭素数本酵素の還元反応の基質を共存させることにより、1種類の酵素でNAD<sup>+</sup>の再生も同時に行うことができる。

【0048】また、ケトン体本発明の2級アルコール脱水素酵素、又は該酵素を生産する微生物(変異株や形質転換微生物を含む) もしくはその処理物を作用させ、光学活性なアルコールを生産することができる。例えば、2-ブタノンから(S)-2-ブタノール、2-オクタノンから(S)-2-オクタノール、アセトフェノンから(S)-1-フェニルエタノール、4-ヒドロキシ-2-ブタノンから(S)-1, 3-ブタンジオール、アセト酢酸エステルから(S)-β-ヒドロキシ-n-酪酸エステルなどを生産することができる。この還元反応により補酵素NADHは酸化され、NAD<sup>+</sup>が生成する。

【0049】生成したNAD<sup>+</sup>は、例えば、微生物の有するNAD<sup>+</sup>をNADHに変換する能力により、NADHに変換(再生)されることができる。このNAD<sup>+</sup>還元活性は、反応系にグルコース、エタノール、辛酸などを添加することにより促進することが可能である。また、反応系に、辛酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素などのNAD<sup>+</sup>をNADHへ還元する能力を有する酵素、又はこれら酵素を含む微生物もしくはその処理物を添加することにより、NAD<sup>+</sup>の還元を行うこともできる。また、本発明の酵素の基質特異性を利用して、反応系にイソプロパノールやエタノールなどの酸化反応の基質を添加することにより、1種類の

50

(7)

特開平7-231785

11

12

酵素でNADHの再生反応を同時に行うこともできる。

【0050】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0051】【実施例1】（2級アルコール脱水素酵素の精製）

キャンディダ・パラブシロシス IF0 13% 株をYM培地（グルコース10g、バクトペプトン5g、酵母エキス3g、麦芽エキス3g/l、pH5.0）で培養し、遠心分離により菌体を固製した。

【0052】得られた菌体を超音圧細胞破砕装置により菌体を破砕後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液にプロテイン硫酸を添加し、核酸及びマイクロゾームを除去した。遠心分離により得られた上清に、硫酸を添加して70%飽和において沈殿した固分を回収した。更に、Q-セファロースFFを用いたアニオン交換クロマトグラフィーを行い、塩化ナトリウムの濃度勾配溶出を行い、2級アルコール脱水素酵素活性を有するピークを回収した。得られた固分を1.62M硫酸を含む緩衝液で平衡化したフェニル 20

-セファロースに添加し、疎水クロマトグラフィーを行った。硫酸濃度を0Mまで減少させ、2級アルコール脱水

\* 水素酵素活性固分を回収した（酵素活性の測定法は前述の方法で行った）。この活性固分をレッド-セファロースのアフィニティーカラムに添加し、赤通り固分をスーパーデックス200のゲルろ過カラムに添加し、ゲルろ過を行った。活性固分を回収し、モノQカラムに添加し、塩化ナトリウムの濃度勾配を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、活性固分をSDS-PAGEで純度検定を行い、単一バンドを示す固分のみを回収した。

10 【0053】得られた2級アルコール脱水素酵素固分は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Native-PAGE）において1本メジャーなバンドと近接する数本の薄いバンドがみられた。活性染色の結果、全てのバンドが2級アルコール脱水素酵素活性を有しており、この酵素標品をSDS-PAGEで解析した結果、単一バンドであった。

【0054】SDS-PAGEにおけるバンドの分子量は、約40000であった（図1）。

【0055】精製の要約を表1に示したが、精製酵素の比活性は、1370 U/mg蛋白質であった。

【0056】

【表1】

	重量 (mg)	粗抽出液 (mg)	純度 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
菌体抽出液	4300	257000	20100	0.155	100.0
プロテイン硫酸	8200	94600	25820	0.971	87.6
0-70%硫酸勾配	550	73700	38700	0.380	76.5
Q-セファロースFF	550	3870	9730	1.10	24.2
フェニルセファロース	22	121	5440	28.5	18.9
ヒートショック	2.4	22.1	6150	279	15.2
スーパーデックス200	0.24	2.7	8140	848	2.8
G/Q	1.05	1.7	2360	1370	5.9

【実施例2】（2級アルコール脱水素酵素の至適pH）

2級アルコール脱水素酵素をカリウム-リン酸緩衝液（KPB）、トリス-塩酸緩衝液（Tris-HCl）、ブリス-ロビンソン緩衝液を用いてpHを変化させて

（S）-2-ブタノールの酸化活性、2-ブタノンの還元活性（（S）-2-ブタノール 酸化活性測定時の条件でNAD<sup>+</sup>をNADH（0.4 μmol）に代えて測定し、NADHの減少に伴う340nmの吸光度の減少を測定したもの）を測定した。最大活性を100とした相対活性で表し、図2、図3に示した。反応の至適pHは、※

\*（S）-2-ブタノール酸化反応が8.5～9.5、2-ブタノンの還元反応が5.5～6.5であった。

【0057】【実施例3】（2級アルコール脱水素酵素の作用至適温度）

2級アルコール脱水素酵素活性を標準反応条件のうち温度だけを変化させて測定した表2に示した。至適温度は50℃であった。

【0058】

【表2】

温度 (°C)	30	37	45	50	55	60
相対活性 (%)	55	65	92	100	88	0

【実施例4】（2級アルコール脱水素酵素のpH安定性）



(8)

特開平7-231785

13

14

トリス-塩酸緩衝液 pH 8.0-9.0、ブリットン-ロビンソン緩衝液 pH 5.0-12.0 中で 30℃、30 分間処理後の残存活性を測定し図 4 に示した。pH 8.0-10.0 において最も安定であった。

【0059】【実施例 5】（2 級アルコール脱水素酵素の耐熱性）

2 級アルコール脱水素酵素を pH 8.0 で 10 分間放置した後、残存活性を測定し図 5 に示した。40℃、10 分間の熱処理後でも 80% 以上の残存活性を有してい

\*た。

【0060】【実施例 6】（2 級アルコール脱水素酵素の基質特異性）

2 級アルコール脱水素酵素を様々なアルコール、アルデヒドと反応し、その酸化、還元反応の活性を（S）-2-ブタノールの酸化、2-ブタノンの還元をそれぞれ 100 とした相対活性で表し、表 3 及び表 4 に示した。

【0061】

【表 3】

基 質	基質濃度 (mM)	NAD <sup>+</sup>	相対活性
2-プロパノール	100	NAD <sup>+</sup>	60.0
(S)-2-ブタノール	50	NAD <sup>+</sup>	100.0
(R)-2-ブタノール	50	NAD <sup>+</sup>	8.9
(S)-2-ブタノール	100	NAD <sup>+</sup>	43.5
2-ペンタノール	100	NAD <sup>+</sup>	34.0
2-ヘキサノール	100	NAD <sup>+</sup>	10.4
(S)-2-オクタノール	50	NAD <sup>+</sup>	27.7
(R)-2-オクタノール	50	NAD <sup>+</sup>	0.0
(S)-2-デカノール	50	NAD <sup>+</sup>	39.2
シクロヘキサノール	20	NAD <sup>+</sup>	52.8
(S)-1-シクロヘキサノール	50	NAD <sup>+</sup>	59.3
(R)-1-シクロヘキサノール	50	NAD <sup>+</sup>	1.1
(S)-1,2-シクロヘキサノール	50	NAD <sup>+</sup>	17.8
(R)-1,2-シクロヘキサノール	50	NAD <sup>+</sup>	0.8
2,4-ペンタジオール	100	NAD <sup>+</sup>	42.8
(2R,4R)-2,4-ペンタジオール	50	NAD <sup>+</sup>	0.1
2,4,6-ヘキサトリオール	20	NAD <sup>+</sup>	40.8
(2S)-1,2,4,5-テトラオール	50	NAD <sup>+</sup>	8.2
(R)-1,2,4,5-テトラオール	50	NAD <sup>+</sup>	7.9

【表 4】

基 質	基質濃度 (mM)	NADH	相対活性
(R)-2-ブタノール	100	NADH	0.3
メタノール	100	NADH	0.2
エタノール	100	NADH	1.0
アセトアルコール	100	NADH	2.4
1-プロパノール	100	NADH	1.3
1-ブタノール	100	NADH	2.8
1-ペンタノール	100	NADH	1.2
(S)-1,2-シクロヘキサノール	50	NADH	2.6
(R)-1,2-シクロヘキサノール	50	NADH	2.0
2-ブタノン	100	NADH	100.0
アセトン	100	NADH	122.4
アセトフェノン	20	NADH	121.8
プロピオンアルデヒド	100	NADH	76.2
4-ヒドロキシ-2-ペンタノール	100	NADH	41.2
2-ヒドロキシ-2-ペンタノール	100	NADH	18.6

【実施例 7】（2 級アルコール脱水素酵素の阻害剤に対する挙動）

2 級アルコール脱水素酵素を様々な試薬中で 30℃、30

0 分間処理し、処理後の活性を、未処理の活性を 100 とした残存活性で表し、表 5 に示した。

【0062】

(9)

特開平7-231785

15

16

【表5】

阻害剤	濃度 (mM)	抑制割合
7,5-ジフルオロベンゾイミド	1	60.0
ペラクロロ水銀安息香酸	0.06	0.0
N-メチルマレイミド	1	81.2
ヨード酸	1	52.0
エタレンジアミン塩酸塩	1	102.5
オーファナントゴリン	1	19.0
EGC <sub>1</sub>	1	0.0
CuSO <sub>4</sub>	1	26.5
ZnCl <sub>2</sub>	1	16.4
ジチオスレイトール	1	0.0
グルチン	1	8.2
NH <sub>2</sub> OH	0.01	92.7
NaN <sub>3</sub>	0.02(X)	88.8
クロトン酸	50	89.0

酵素活性は、ジチオスレイトール (DTT)、ヨードアセトアミド、ペラクロロ水銀安息香酸、塩化水銀、塩化亜鉛、高濃度の亜鉛キレート、2-メルカプトエタノールによって顕著に阻害された。

【0063】【実施例8】(2級アルコール脱水素酵素の部分アミノ酸配列の解析)

精製した2級アルコール脱水素酵素 0.153mg を 50mM トリス-塩酸 pH9.0, 4M 尿素中において 0.53 μg のリジルエンドペプチダーゼで 30℃, 6時間消化した。切断されたペプチド断片を逆相 HPLC (東ソー製 TSK ODS-120T カラム) を用い、0.1% トリフルオロ酢酸中におけるアセトニトリルの勾配溶出により分離し、分取した。

【0064】分取したペプチドを ABI 製プロテインシーケンサー 477A によりアミノ酸配列を決定した。

【0065】プロテインシーケンサーによって決定されたアミノ酸配列は、図6、7、8のアミノ酸配列にアンダーラインで示した。

【0066】【実施例9】(2級アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子の PCR クローニング)

2級アルコール脱水素酵素のN末端に近い部分のアミノ酸配列から予想される DNA 配列を塩基を考慮して合成し、融合 PCR プライマー (CpN) とした。また、C末端に近い部分のアミノ酸配列から予想される DNA 配列の相補配列をもう一方の融合 PCR プライマー (CpT10) として合成した。これら配列を図9に示した。なお、DNA の合成は、ABI 製 DNA シンセサイザー 381A により行った。

【0067】【実施例10】(キャンディダ・パラブシロシスからの染色体 DNA の調製)

キャンディダ・パラブシロシス IFO 1395 を YEPD 培地 (1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース) 100mL 中で培養し、遠心分離により菌体を回収し

た。菌体を 25mL の 1M ソルビトール、0.1M エチレンジアミン 4 酢酸 (EDTA) に懸濁し、再度遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体を 10mL の 50mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5, 1M ソルビトール、0.1M 2-メルカプトエタノールで懸濁し、更に、2.5mg/mL チモリアーゼを 0.4mL 添加し、30℃でインキュベートすることによりプロトプラストを形成した。換液によりプロトプラスト形成を確認後、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体を、12mL の 50mM トリス-塩酸 pH7.4, 20mM EDTA に懸濁し、更に、1.2mL の 10% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を添加後よく混合した。この状態で 55℃, 30分間インキュベートした後、3.6mL の 5M 酢酸カリウム pH5.0 を添加し、氷上で 60分間放置し、タンパク質を変性沈殿させた。

【0068】遠心分離により変性タンパク質を分離し、上清を回収後、等量のイソプロパノールを直ぐに添加し、ゆっくりと混合した。遠心分離により沈殿した DNA を回収し、乾燥後、15mL の 10mM トリス-塩酸緩衝液 pH7.4, 2mM EDTA に溶解し、3mg/mL RNase (リボヌクレアーゼ) 0.75mL を添加し、37℃, 1時間インキュベートし、突然変異する RNA を分解した。RNA 分解後、フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿により DNA を回収し、実施例11における PCR 反応の鋳型 DNA とした。

【0069】【実施例11】(2級アルコール脱水素酵素遺伝子の PCR 法によるクローニング)

実施例9において合成した2種類の融合 PCR プライマー (CpN 及び CpT10) 100pmol, 実施例10において調製したキャンディダ・パラブシロシス染色体 DNA 50ng を含む PCR 用緩衝液 (10mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.3, 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム, 各 0.2mM dNTP, 0.01% セラチン, 2U Taq DNA ポリメ

(10)

特開平7-231785

17

ラーゼ(ロシュ社製)を用製し、熱変性(94°C、30秒)、アニーリング(45°C、30秒)、伸長反応(65°C、2分)を30サイクル行い、4°Cまで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。

【0070】【実施例12】(PCR法によって増幅したDNAのサブクローニング)

実施例11においてPCR法により増幅されたDNAをSureClone Ligation Kit (ファルマシア社製)によりpUC18にサブクローニングし、その塩基配列をABI製DNAシーケンサー373Aにより決定した結果、PCRプライマー配列を含めて97塩基からなっていた。その配列は図6、7、8に示したDNAのうち、プライマーCpn及びCpnl0間に当たる部分である。以後この配列を「コア配列」と記す。

【0071】【実施例13】(逆PCR法によるコア配列両端配列のクローニング)

コア配列の5'-側に近い部分の相補配列CAATTGACCCCTTTGGC (CPA-MUN)、及び、3'-側に近い部分の配列TTCGATCTTGGATGTTTTG (CPA-NSP)を化学合成した。2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAにおける合成した逆PCRプライマーの位置を図6、7、8に示した。

【0072】逆PCRのDNA増殖として、まず、キャンディダ・パラブシロシスの染色体DNAを制限酵素HaeIIにより消化し、消化物をT4 DNAリガーゼを用いて自己環化した。この自己環化物50ng、化学合成したプライマーCPA-MUN及びCPA-NSPをそれぞれ20pmol含むPCR用緩衝液(実施例11に記載のもの)を用い、熱変性(94°C、30秒)、アニーリング(50°C、30秒)、伸長反応(70°C、2分)のサイクルを30回行った。増幅されたDNA断片を実施例12と同様にSureClone Ligation Kit (ファルマシア社製)を用いてpUC18にサブクローニングし、ABI製DNAシーケンサー373Aにより全塩基配列を決定した。

【0073】PCR及び逆PCRにより得られた2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAの全塩基配列及び該DNAがコードするアミノ酸配列を図6、7、8にまとめた。

【0074】【実施例14】(2級アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子のPCR法を用いた合成)

まず、プライマーを用いてPCR法により制限酵素部位の導入を行った。実施例10において得たDNAを鋳型とし、プライマーとしては、EcoRIの制限酵素部位を含む5'-プライマー「CPA-ATC」(5'-TCCGAATTCAATGTCATTCATCAACCCAG-3')とBglII部位を含む3'-プライマー「CPA-TAG」(5'-ACATCTTACTATCCATTAACAACCTTA-3')により約1030bpのDNA断片をPCR法により増幅し、遺伝子断片を得た。DNAの合成は、ABI社製DNAシンセサイザー381Aにより行

18

い。PCR反応は実施例11と同様に行った。

【0075】【実施例16】(PCR法によって増幅したDNAのサブクローニング)

実施例14により増幅されたPCR断片をSureClone Ligation Kit (ファルマシア社製)にてプラスミドpUC18マルチクローニングサイトのSmaI部位に連結した(図10)。構築されたプラスミド(pCPA6R)は、ラクトースプロモーター(図中「lacZ」で示す部分に含まれる)とは逆向きに挿入されていた。

【0076】【実施例16】(2級アルコール脱水素酵素遺伝子発現プラスミドpKK-CPA1の構築)  
さらに、2級アルコール脱水素酵素を発現ベクターpKK223-3 (ファルマシア社製)にサブクローニングし、pKK-CPA1を構築した。pKK-CPA1の構築方法は以下の通りである。pCPA6RをEcoRI (プロモカ社製)消化し、HindIIIリンカー(タカラ社製)を連結した上でEcoRI (タカラ社製)およびHindIII (タカラ社製)で切断後、2級アルコール脱水素酵素を有する断片を抽出し、発現ベクターpKK223-3を制限酵素EcoRIおよびHindIIIで切断したものと連結することにより、2級アルコール脱水素酵素遺伝子発現ベクターpKK-CPA1を構築した(図11)。

【0077】【実施例17】(2級アルコール脱水素酵素の生産)

イシエリヒア・コリ(Escherichia coli) JM109のコンピタントセルを調製し、発現ベクターpKK-CPA1で形質転換することにより、2級アルコール脱水素酵素生産菌株を作成した。この菌株を、0.1mg/mlの濃度でアンピシリンを添加したLB培地(1.0%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1.0%塩化ナトリウム、pH7.2)中で30°C、3時間培養した。最終濃度1mgとなるようにイソプロピルチオガラクトンド(IPTG)を加えてさらに5時間培養し、培養液を遠心分離し、棄置した。

【0078】【実施例18】(酵素反応での活性評価)  
実施例17に従って調製した菌株を50mM Tris-HCl pH9.0、0.01%β-メルカプトエタノールに懸濁し、超音波粉砕して粗酵素溶液を得た。該酵素液を50mM トリス塩酸緩衝液 pH9.0、50mM(S)-1,3-ブタンジオール、2.5mM NAD<sup>+</sup>から成る30°Cの反応液に加え、NAD<sup>+</sup>の増加に伴う340nmの吸光度を測定することで(S)-1,3-ブタンジオール酸化活性を測定した。結果を表8に示す。なお、対照として、発現プラスミドpKK-CPA1で形質転換していない宿主イシエリヒア・コリを用い、実施例18と同様に行った結果を表8に同時に示す。

【0079】

【表8】

(11)

特開平7-231785

19

20

菌株名

比活性 (Unit/mg)

イシユリヒア・コリ JM109 (pKK-CPA1)

0.581

イシユリヒア・コリ JM108

0.0

【実施例19】(遺伝子組換え菌体による(R)-1, 3-ブタンジオールの生産)

実施例17に従って調製した菌体に最終濃度5%となるようラセミ1, 3-ブタンジオールと0.8%炭酸カルシウム水を加え、直径2mm試験管にて30°C、250rpmで17時間振とう反応させた。なお、反応開始時における菌体濃度を660nmにおけるODが2.0となるようにした。反応終了後、遠心分離にて除菌し、得られた上澄液500μlを塩化ナトリウムで飽和させた後、酢酸エチル2mlを用いて残存する1, 3-ブタンジオールを抽出した。抽出液を脱溶媒後、残渣に塩化アセチル100μlを加えて、アセチル化した。これに1ml n-ヘキサンを加えてアセチル化した1, 3-ブタンジオールを溶解し、光学

分析カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー〔カラム: キラルセルOB (ダイセル化学工業株式会社製)、溶媒: n-ヘキサン/2-プロパノール=19:1 波長220nm, 流速1.0ml/分、温度45°C〕にて光学純度を測定した(保持時間: (S) 体13分、(R) 体19.3分)。また、先の上澄液を蒸留水にて適宜希釈した後、ガスクロマトグラフィー〔カラム: Thermo 3000 5% / chromosorb W 80~100 メッシュ (内径3mm × 長さ2.3m) (信和化工株式会社製)、温度130°C〕にて1, 3-ブタンジオール濃度を定量した。得られた1, 3-ブタンジオールの光学純度、収率を表7に示す。なお、対照として、発現プラスミドpKK-CPA1で形質転換していない宿主イシユリヒア・コリを用い、実施例19と同様に行った結果を表7に同時に示す。なお、表7中で、収率とは「最初に添加したラセミ1, 3-ブタンジオールに対する、反応終了後残存した1, 3-ブタンジオールのモル比」を表す。

【0080】

【表7】

菌株名

光学純度(%)

収率(%)

イシユリヒア・コリ JM109 (pKK-CPA1)

98.8

46.3

イシユリヒア・コリ JM108

0.0

88.8

【0081】

【発明の効果】本発明により、新規な、立体特異性を有する2級アルコール脱水素酵素、該酵素をコードするDNA、該酵素をコードするDNAにより形質転換された微生物を得ることが可能になった。

【0082】本酵素又は本酵素を産生する微生物(変異株や形質転換微生物を含む)もしくはその処理物を用いることにより、ラセミ体アルコールからの光学活性アルコールの製造、非対称ケトンからの光学活性アルコールの製造などを効率的に行うことが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 精製した2級アルコール脱水素酵素のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるパターンを示す図である。

【図2】 2級アルコール脱水素酵素の(S)-2-ブタノール酸化反応のpH依存性を至適pHを1.0とした相対活性で示す図である。

【図3】 2級アルコール脱水素酵素の2-ブタノン還元反応のpH依存性を至適pHにおける活性を1.0とした相対活性で示す図である。

【図4】 2級アルコール脱水素酵素を各pHにおいて30°C、30分処理した後の残存活性を示す図である。

【図5】 2級アルコール脱水素酵素を各温度で10分処理した後の残存活性を示す図である。

【図6】 2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAの塩基配列、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列、PCRプライマー及び逆PCRプライマーの部位を示す図である。

【図7】 2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAの塩基配列、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列、PCRプライマー及び逆PCRプライマーの部位を示す図である。

【図8】 2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAの塩基配列、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列、PCRプライマー及び逆PCRプライマーの部位を示す図である。

【図9】 PCR用混合プライマーCpN、CpT10の構造を示す図である。なお、図中同一部位に複数の塩基が記載してあるものは、混合プライマーがそれら複数の塩基を有するプライマーの混合物になっていることを

(12)

特開平7-231785

21

22

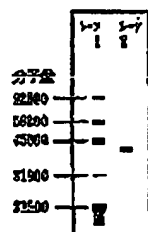
示す。

【図10】 プラスミドpCPA6Rの構成を示す図である。

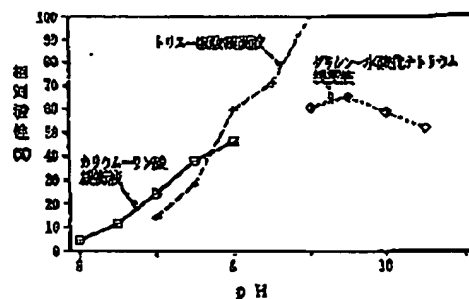
\*【図11】 発現ベクターpKK-CPA1の構成を示す図である。

\*

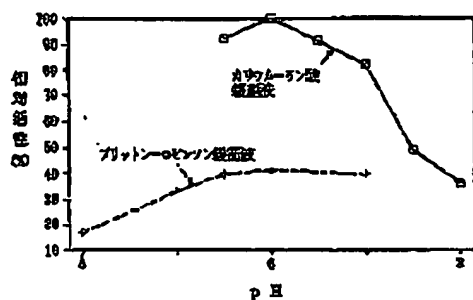
【図1】



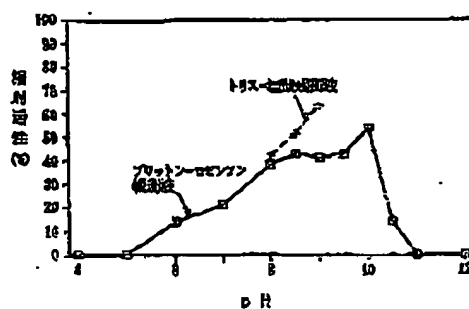
【図2】



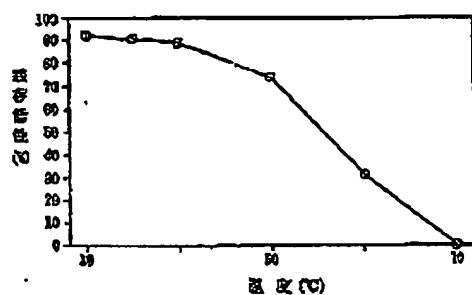
【図3】



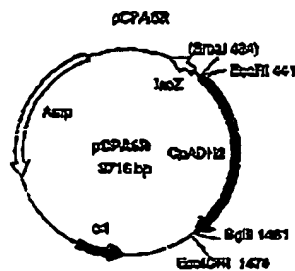
【図4】



【図5】



【図10】





(14)

特開平7-231785

【図7】

370 380 390 400 410 420  
TACGATGCTGCTATCAACAGTACTTGTGTTACTAGACCACGTAACTTGTCTCGTATC  
TyrAspGlyGlyTyrGlnGlnTyrLeuLeuValThrArgProArgAsnLeuSerArgIle

430 440 450 460 470 480  
CCAGATTAACGTATCTCCAGACCTGCTCCGCTTCACCTGATCTGTATTGACACCATAT  
ProAspAsnValSerAlaAspValAlaAlaAlaSerThrAspAlaValLeuThrProTyr

490 500 510 520 530 540  
CACGCAATCAAGATGCTCAAGTCTCACCAACTTCGAATATCTTGTATTCTGCTGCT.  
HleAlaIleLysAsnAlaGlnValSerProThrSerAsnIleLeuLeuIleGlyAlaGly

550 560 570 580 590 600  
GGATTGGTGGAAATGCAATTCAAGTTGCCAAGGCATTTGTTCCAAAGTTACTGTTTTG  
GlyLeuGlyGlyAsnAlaIleGlnValAlaLysAlaPheGlyAlaLysValThrValLeu

610 620 630 640 650 660  
GACAAAAAAGCAGCTCGTCAACAGCAAAQAAGTTGGTGTGATGCCATTTATGAAA  
AspLysLysLysGluAlaArgAspGlnAlaLysLysLeuGlyAlaAspAlaValTyrGln

670 680 690 700 710 720  
ACATTGCCASATCCATTTCTCTGAGTCTTTTTCAGCATCTTTTCAATTTGTTTCACTG  
ThrLeuProGlnSerIleSerProGlySerPheSerAlaCysPheAspPheValSerVal

730 740 750 760 770 780  
CAGCTACATTTGATGTATGTCAAAAGTATGTTGAACCAAGGCTGTAATTATCCCCCTG  
GlnAlaThrPheAspValCysGlnLysTyrValGlnProLysGlyValIleMetProVal

(15)

特開平7-231785

【図8】

790 800 810 820 830 840  
GGACTCGGTGCTCCTAATTTATCGTTTAATTGGGAGATTGGCAATTGAGAGAAATTGGA  
GlyLeuGlyAlaProAsnLeuSerPheAsnLeuGlyAspLeuAlaLeuArgGluIleArg

850 860 870 880 890 900  
ATCTTGGGTAGTTTTTGGGAACTACTAATGATTTCGATGATGTTTTGAAATTGCTTACT  
IleLeuGlySerPheTrpGlyThrThrAsnAspLeuAspAspValLeuLysLeuValSer  
CPA-NSP →

910 920 930 940 950 960  
GAAAGGTAAAGTTAAACCCGTTCTGAGAAGTGCCAAATTGAAGGAATTGCCAGACTATATT  
GluGlyLysValLysProValValArgSerAlaLysLeuLysGluLeuProGluTyrIle

970 980 990 1000 1010  
GAAAAATTGAGAAACAATGCTTATGAAAGGTAGAGTTGTTTTTAATCCATAG  
GluLysLeuArgAsnAsnAlaTyrGluGlyArgValValPheAsnProGlu

CpT10



(15)

特開平7-231785

【図9】

組合プライマーCpN、CpT10の塩基配列

(CpN)

アミノ酸配列: Tyr-Gly-Phe-Phe-Phe-Ileu-Lys-Glu

DNA配列: 5' TAT-GGT-TTT-GTT-TTT-ATT-ATA-GA 3'

(CpN)      G C G C G C G

A A

G G

(CpT10)

アミノ酸配列: Ala-Ileu-Ala-Phe-Glu-Ala-Lys

DNA配列: 5' ATT-ATT-GCT-TAT-GTA-GCT-CG 3'

C C G C G C A

A A

G G

塩基配列: 5' TTA-TTA-GAA-ATA-CTT-GCA-AC 3'

(CpT10)      G G G G C G T

T T

C C

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>°</sup>

識別記号 庁内整理番号

F I

特許表示箇所

C 1 2 P 41/00

C 9452-4B

//C 1 2 N 9/04

C 1 2 R 1:72)

C 1 2 R 1:72)

C 1 2 R 1:19)

C 1 2 R 1:19)

C 1 2 R 1:21)

C 1 2 R 1:19)

C 1 2 R 1:72)

C 1 2 P 41/00

C 1 2 R 1:72)

ZNA

C 1 2 R 1:72)

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-231785

(43)Date of publication of application : 05.09.1995

(51)Int.Cl.

C12N 9/04  
C12N 1/21  
C12N 15/09  
C12P 41/00  
// (C12N 9/04  
C12R 1:72 )  
(C12N 9/04  
C12R 1:19 )  
(C12N 1/21  
C12R 1:19 )  
(C12N 15/09  
C12R 1:72 )  
(C12P 41/00  
C12R 1:72 )

(21)Application number : 06-181308

(71)Applicant : DAICEL CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 02.08.1994

(72)Inventor : KOJIMA TOMOKO  
YAMAMOTO HIROAKI  
KAWADA NAOKI  
MATSUYAMA AKIKAZU

(30)Priority

Priority number : 05261649  
05337191

Priority date : 24.09.1993  
28.12.1993

Priority country : JP  
JP

(54) NEW ENZYME, ITS PRODUCTION, DNA CODING THE SAME ENZYME, TRANSFORMANT CONTAINING THE SAME DNA AND PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE ALCOHOL OR THE LIKE BY THE SAME ENZYME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new enzyme useful for production of an alcohol, an aldehyde or a ketone, especially for production of an optically active alcohol.

CONSTITUTION: This enzyme can oxidize an alcohol in the presence of NAD<sup>+</sup> as a coenzyme to synthesize a ketone or an aldehyde and can reduce a ketone or an aldehyde in the presence of NADH as a coenzyme to synthesize an alcohol. Aliphatic alcohols including aromatic-substituted alcohols are substrates in the oxidation reaction and a higher activity is shown on the secondary alcohol than on the primary alcohol. S-form compound of 2-butanol is preferentially oxidized. Aldehydes or aliphatic ketones including aromatic-substituted ketones are substrates in the reduction reaction and the molecular weight is about 40000 (SDS-PAGE). The optimum pH is 8.5 to 9.5 in the case of oxidation reaction of S-2-butanol or 5.5 to 6.5 in the case of reduction of 2-butanone. A high activity is shown in a temperature range of 25 to 55° C and the optimum temperature is 50° C. This enzyme can be obtained not only from a cultured material of *Candida parapsilosis* IFOS 1396 strain but from a cultured material of a gene recombinant strain.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

05.06.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

**Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The enzyme which has the physicochemical property shown in \*\* from \*\* of a degree.

\*\* Oxidize alcohol by using operation NAD<sup>+</sup> (oxidization mold nicotinamide adenine dinucleotide) as a coenzyme, and generate a ketone or an aldehyde. Moreover, a ketone or an aldehyde is returned by using NADH (reduction type nicotinamide adenine dinucleotide) as a coenzyme, and alcohol is generated.

\*\* Consider as the substrate of oxidation reaction of fatty alcohol including substrate specificity aromatic substitution. As compared with the 1st class alcohol, activity is high to the 2nd class alcohol. It oxidizes preferentially [ S 2-butanol ]. Let an aliphatic series ketone including an aldehyde or aromatic substitution be the substrate of a reduction reaction.

\*\* It is about 40,000 when it measures by molecular weight SDS-PAGE.

[Claim 2] Candida (Candida) The manufacture approach of an enzyme according to claim 1 which cultivates the microorganism which belongs to a group and produces the enzyme of claim 1, and is characterized by acquiring this enzyme from a culture.

[Claim 3] the microorganism which belongs to the Candida group in an approach according to claim 2 — Candida PARAPUSHIROSHISU (Candida parapsilosis) it is — approach characterized by things.

[Claim 4] DNA which carries out the code of the enzyme according to claim 1.

[Claim 5] DNA to which an amino acid sequence is substantially characterized by including the base sequence to which the code of the protein with which it is shown in drawing 6, and 7 and 8 is carried out in DNA according to claim 4.

[Claim 6] DNA to which an amino acid sequence is characterized by including the base sequence to which the code of the protein with which it is shown in drawing 6, and 7 and 8 is carried out in DNA according to claim 5.

[Claim 7] DNA to which an amino acid sequence is characterized by including the base sequence to which the code of a permutation, insertion, or the protein that carries out deletion is carried out for drawing 6 and the array as which it is indicated in 7 and 8 in DNA according to claim 5.

[Claim 8] The vector characterized by including DNA according to claim 4 to 7.

[Claim 9] The microorganism in which the transformation was carried out by DNA according to claim 4 to 7.

[Claim 10] The manufacture approach of an enzyme according to claim 1 which cultivates a microorganism according to claim 9 and is characterized by acquiring an enzyme according to claim 1 from a culture.

[Claim 11] The manufacture approach of alcohol characterized by making the microorganism which produces an enzyme according to claim 1 or this enzyme, or its processing object act on a ketone or an aldehyde, returning this ketone or an aldehyde, and manufacturing alcohol.

[Claim 12] The manufacture approach of the optical-activity alcohol characterized by making the microorganism which produces an enzyme according to claim 1 or this enzyme, or its processing object act on an unsymmetrical ketone, returning this unsymmetrical ketone, and manufacturing optical-activity alcohol.

[Claim 13] The manufacture approach of the ketone or aldehyde characterized by making the microorganism which produces an enzyme according to claim 1 or this enzyme, or its processing object act on alcohol, oxidizing this alcohol, and manufacturing a ketone or an aldehyde.

[Claim 14] The manufacture approach of the optical-activity alcohol which the microorganism which produces an enzyme according to claim 1 or this enzyme, or its processing object is made to act on racemic-modification alcohol, and is characterized by acquiring the optical-activity alcohol which oxidizes preferentially and remains one side of an optical isomer.

[Claim 15] The approach according to claim 11 to 14 characterized by making the enzyme, the microorganism according to claim 9, or its processing object of the microorganism origin according to claim 9 act.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]**

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the microorganism in which the transformation was carried out to manufacture of alcohol, an aldehyde, and a ketone, especially manufacture of optical-activity alcohol by the manufacture approach of the useful new 2nd class alcoholic dehydrogenase and this enzyme, DNA which carries out the code of this enzyme, and this DNA, and the method of manufacturing alcohol, an aldehyde, a ketone, especially optical-activity alcohol using this enzyme.

[0002]

[Description of the Prior Art] As the 2nd class alcoholic dehydrogenase which a microorganism produces, it is thermostable ANAEROBIUM BUROKKI which requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (it abbreviates to NADP+ hereafter) as a coenzyme. (Thermoanaerobium brockii) The alcoholic dehydrogenase (J. Am. Chem. Soc. 108 and 162-169 (1986)) of the origin is known. moreover, as the 2nd class alcoholic dehydrogenase which requires nicotinamide adenine dinucleotide (it abbreviates to NAD+ hereafter) as a coenzyme Pichia ESUPI NRRL-Y-11328 (Pichia sp. NRRL-Y-11328: Eur. J. Biochem. 101 and 401-406 (1979)), Pseudomonas ESUPI SPD6 (Pseudomonas sp. SPD6: Bioorg. Chem. 19 and 398-417 (1991)), Pseudomonas fluorescens NRRL B-1244 (Pseudomonas fluorescens NRRL B-1244: JP, 59-17982, A), Pseudomonas malto filler MB11L (Pseudomonas maltophilia MB11L: FEMS Microbiol. Lett. 93, 49-56 (1992)), Pseudomonas ESUPI PED (Pseudomonas sp. PED: J. Org. Chem. 57 and 1526-1532 (1992)), Pseudomonas ESUPI ATCC 21439 (Pseudomonas sp. ATCC 21439: Eur. J. Biochem. 119 and 359-364 (1981)), Candida BOIDINI SAHM (Candida boidinii SAHM: Biochim. Biophys. Acta 716 and 298-307 (1992)), Mycobacterium BAKAE JOB-5 (Mycobacterium vaccae JOB-5: J. Gen. Microbiol. 131 and 2901-2907 (1985)), Rhodococcus RODOKUROUSU PNKb1 (Rhodococcus rhodochrous PNKb1: Arch. Microbiol. 153 and 163-168 (1990)), Comamonas TERIGENA (Comamonas terrigena: Biochim. Biophys. Acta 661 and 74-86 (1981)), Arthrobacter ESUPI The enzyme of the SBA (Arthrobacter sp. SBA: JP, 51-57882, A) origin is reported.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, the stereoselectivity of the 2nd class alcoholic dehydrogenase of these is unsatisfying. For example, 2-butanol with most reports as a substrate of the 2nd class alcoholic dehydrogenase is received. (S)-2-butanol is oxidized stereoselectively and the enzyme which has the activity which generates 2-butanone is not known (Pseudomonas ESUPI ATCC 21439 —) Pseudomonas ESUPI SPD6, Comamonas TERIGENA, Candida BOIDINI SAHM Or Pichia ESUPI NRRL-Y-11328 In the enzyme to produce, R bodies oxidize preferentially. Pseudomonas fluorescens Stereoselectivity is not shown in the enzyme which NRRL B-1244 produce. Mycobacterium BAKAE JOB-5, Rhodococcus RODOKUROUSU PNKb1, Pseudomonas ESUPI PED or Pseudomonas malto filler The stereoselectivity is not indicated in the enzyme which MB11L produces. In addition, although there is a report of oxidizing S bodies preferentially about 2-butanol (Arch. Biochem. Biophys., 126, 933-944 (1968), J. Biol. Chem., 268, 7792-7798 (1993)), the 1st class alcoholic dehydrogenase (SADH I) of the baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) origin of the relative activity is very as low as about 1% of ethanol, and cannot bear practical use at all.

[0004] That is, the 2nd class alcoholic dehydrogenase which oxidizes (S)-2-butanol preferentially was not known until now, but to find out the 2nd class alcoholic dehydrogenase with high stereoselectivity was desired strongly.

[0005] Moreover, since it became possible to manufacture this enzyme in large quantities using the technique of gene engineering when cloning of the gene of this enzyme could be carried out, to carry out cloning of the gene which carries out the code of this enzyme was desired strongly.

[0006]

[Means for Solving the Problem] this invention persons are the microorganism which screens widely the microorganism which has the capacity which oxidizes (S)-2-butanol preferentially, and belongs to the Candida group, especially Candida PARAPUSHIROSHISU. (Candida parapsilosis) It found out having the capacity which oxidizes (S)-2-butanol preferentially. Furthermore, this microorganism was cultivated and the enzyme which oxidizes (S)-2-butanol from that fungus body was refined. And as a result of examining the property, it found out that this enzyme oxidizes (S)-2-butanol with high stereoselectivity, and oxidizing stereoselectively the 2nd class alcohol other than [ many of ] (S)-2-butanol further.

[0007] That is, this invention offers the enzyme which has the physicochemical property shown in \*\* from \*\* of a degree.

\*\* Operation NAD+ It considers as a coenzyme, alcohol is oxidized and a ketone or an aldehyde is generated. Moreover, a ketone or an aldehyde is returned by using NADH as a coenzyme, and alcohol is generated.

[0008] \*\* Consider as the substrate of oxidation reaction of fatty alcohol including substrate specificity aromatic substitution. As compared with the 1st class alcohol, activity is high to the 2nd class alcohol. It oxidizes preferentially S 2-butanol ].

[0009] Let an aliphatic series ketone including an aldehyde or aromatic substitution be the substrate of a reduction reaction.

[0010] \*\* It is about 40,000 when it measures by molecular weight SDS-PAGE. In addition, the physicochemical properties and enzymology-properties other than the above of the enzyme of this invention are as follows.

[0011] \*\* Optimal pH and the optimal pH of stable pH (range S)-2-butanol oxidation reaction are 8.5-9.5. The optimal pH of a 2-butanone reduction reaction is 5.5-6.5.

[0012] It is comparatively stable by pH 8.0-10.0.

[0013] \*\* Activity is high in the 25-55 degrees C of the range of operation optimal temperature, and 50 degrees C is optimum temperature.

[0014] \*\* It has 90% or more of residual activity also after heat treatment for [ condition 40 degrees-C ] 10 minutes of deactivation by temperature.

[0015] \*\* It is prevented with SH reagents, such as inhibition and a stabilization Para hydroxybenzoic acid, a mercury chloride, a copper chloride, a zinc chloride, and N-ethyl malei mide. Although it is prevented by 2-mercaptoethanol of a reducing agent, and dithiothreitol and is prevented by o-phenanthrolin, it is not prevented in ethylenediaminetetraacetic acid.

[0016] \*\* It can refine by combining the purification approach of purification approach usual protein suitably. For example, by performing protamine sulfuric-acid precipitation after crushing a fungus body, salting out the centrifugal separation supernatant liquid using an ammonium sulfate, and combining an anion-exchange chromatography, a canal chromatography, and the gel filtration further, it can refine until it becomes a single band by sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (it abbreviates to SDS-PAGE hereafter).

[0017] \*\* Although it has set to isoelectric point isoelectric focusing and the band of shoes was generated, the isoelectric point of main bands was 6.7.

[0018] in addition, measurement of all the 2nd class alcoholic dehydrogenase activity including an example detail in the letter [ this ] was performed by the approach shown below. 50micro (pH9.0) of namely, tris-hydrochloric-acid buffer solutions mol NAD+2.5 mumol (S)-2-butanol 50micromol And 340nm which is made to react at 30 degrees C among the reaction mixture containing an enzyme, and originates in generation of NADH Increase of an absorbance was measured. 1U is in 1 minute. 1micromol It considered as the amount of enzymes which carries out the catalyst of the generation of NADH.

[0019] Moreover, this invention offers DNA which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase. That is, this invention persons digested the refined 2nd class alcoholic dehydrogenase by RIJIRU proteinase, and determined a part of amino acid sequence by the protein sequencer after refining the fragment cut by Opposition HPLC. It is PCR (Polymerase Chain Reaction) based on the acquired amino acid sequence. The \*\* primer is compounded and it is Candida PARAPUSHIROSHISU. (Candida parapsilosis) PCR which used Chromosome DNA as mold was performed, a part of gene which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase was amplified, and the base sequence (core array) was clarified. Furthermore, it is Candida PARAPUSHIROSHISU in order to clarify the base sequence of the boundary region of the acquired DNA array (core array). (Candida parapsilosis) Restriction enzyme with which the recognition sequence does not exist Chromosome DNA during a core array HaeII It digested, self-cyclization of the generated DNA fragment was carried out by T4 ligase, and the template DNA for reverse PCR (Nucleic Acids Res.16 and 8186) (1988) was prepared. Next, the primer used as the start point of DNA synthesis which goes to the outside of a core array was compounded based on the core array, and the boundary region of a core array was amplified by reverse PCR on it. As a result of clarifying the base sequence of obtained DNA, it checked that all the coding regions of drawing 6 and the 2nd class alcoholic dehydrogenase shown in 7 and 8 were contained in DNA which carried out self-cyclization. Furthermore, the manifestation product in the inside of the Escherichia coli host of the gene which carried out cloning checked having the same activity as the 2nd class alcoholic dehydrogenase of the Candida PARAPUSHIROSHISU origin.

[0020] DNA which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase of the invention in this application is characterized by having the activity of the 2nd class alcoholic dehydrogenase, and an amino acid sequence including substantially drawing 6 and the base sequence to which the code of the protein with which it is shown in 7 and 8 is carried out. As long as "it is substantial" has the activity of the 2nd class alcoholic dehydrogenase, it is shown here that there may be some deletion of amino acid, insertion, a permutation, etc. about drawing 6 and the amino acid sequence shown in 7 and 8. Although it cannot be overemphasized that DNA which turns into DNA of this invention from drawing 6 and 1008 bases shown in 7 and 8 is contained, the invention in this application is not restricted to this. In addition, it can perform suitably changing DNA so that some deletion of amino acid, insertion, a permutation, etc. may be produced about the amino acid sequence in which DNA carries out a code by the well-known approaches, such as the site-specific mutation introducing method for having used the synthetic oligonucleotide. Moreover, DNA into which variation was introduced at random can be obtained by using as mold DNA which changed suitably DNA or this DNA containing drawing 6 and 1008 bases shown in 7 and 8, making low concentration of the bottom of existence of Mn2+ ion (usually 0.5-10 concentration of mM), or a specific nucleotide, and performing the PCR method. Thus, it cannot be overemphasized that what carries out the code of the protein which has the activity of the 2nd class alcoholic dehydrogenase among obtained DNA is contained in the invention in this application.

[0021] Furthermore, this invention offers the microorganism which has the 2nd class alcoholic dehydrogenase productivity to which the transformation of the amino acid sequence was substantially carried out by drawing 6 and DNA to which the code of the protein with which it is shown in 7 and 8 is carried out.

[0022] The microorganism set as the object of a transformation in this invention A transformation is carried out by DNA which carries out the code of the polypeptide which has the 2nd class alcoholic dehydrogenase activity. As long as it is the microorganism which can discover the 2nd class alcoholic dehydrogenase activity, what kind of thing may be used. Specifically ISHIERIHIA (Escherichia) A group, a bacillus (Bacillus) group, and Pseudomonas (Pseudomonas) A group, a Serratia (Serratia) group, a BUREBI bacterium (Brevibacterium) group, and KORINEBAKUTERIUMU (Corynebacterium) Group, A streptococcus (Streptococcus) group and Lactobacillus (Lactobacillus) Hosts, such as a group, the bacteria with which the vector system is developed, Saccharomyces (Saccharomyces) A group and Clive ROMAISESU (Kluyveromyces) A group and Schizosaccharomyces (Schizosaccharomyces) A group and a CHIGOSAKKAROMAISESU group (Zygosaccharomyces), The Yarrowia (Yarrowia) group, the Trichosporon (Trichosporon) group, A RODOSUPORIUMU (Rhodosporidium) group and Hansenula (Hansenula) Group, The Pichia (Pichia) group and Candida (Candida) Yeast, such as a group, A noy ROSUPORA (Neurospora) group and Aspergillus (Aspergillus) A group, a cephalosporium (Cephalosporium) group, and Trichoderma (Trichoderma) The mold belonging to a group etc. is contained.

[0023] The procedure thru/or the approach itself for production of a transformant can be performed according to the technique commonly used in the field of molecular biology, bionics, and gene engineering.

[0024] In order to make the gene of this invention discover in a microorganism, it is necessary to insert this gene into the plasmid vector which exists in stability in a microorganism first, or a phage vector. Moreover, in order to make DNA of this invention discover in a microorganism, it is necessary to make the genetic information which it has imprint and

translate. For that purpose, he is the promotor who hits the unit which controls an imprint and a translation 5' of DNA of this invention - It is a terminator to the side upstream 3' - What is necessary is just to include in a side lower stream of a river, respectively. It is necessary to use the promotor and terminator with which functioning as this promotor and a terminator into the microorganism used as a host is known. these various microorganisms — setting — an available vector, a promotor, a terminator, etc. — being related — "microbiology basic lecture 8 gene engineering and KYORITSU SHUPPAN" — especially — yeast — being related — "Adv.Biochem.Eng.43 and 75-102" (1990), or "Yeast 8 and 423-488" (1992) etc. — it is described by the detail.

[0025] For example, in an ISHIERIHIA group, especially *Escherichia coli* ISHIERIHIA KORI (*Escherichia coli*), it is possible as a plasmid vector to use pBR and a pUC system plasmid, and it is lac (the promotor originating in gamma-galactosidase, trp (tryptophan operon), tac (fusion of lac and trp), lambda phage PL, PR, etc. can be used.). Moreover, as a terminator, it is trpA. The origin, the phage origin A rrnB RIBOSO mull terminator etc. can be used.

[0026] It sets to *Bacillus* and is a pUB110 system plasmid and pC194 as a vector. A system plasmid etc. is available and can also make it insert in a chromosome directly. moreover — as a promotor and a terminator apr (alkaline protease), npr (neutral protease), and amy (alpha-amylase) etc. — it can use.

[0027] *Pseudomonas* — setting — *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) and *Pseudomonas SEPASHIA* (*Pseudomonas cepacia*) etc. — plasmid which the host-vector system is developed and participates in disassembly of a toluene compound TOL Extensive host range vector (a gene required for the autonomous duplicate originating in RSF1010 etc. is included) pKT 240 based on a plasmid etc. — it is available and a lipase gene (JP,5-284973,A) etc. can be used as a promotor and a terminator.

[0028] *Brevibacterium* — especially — *BUREBI bacterium RAKUTO fur mentum* (*Brevibacterium lactofermentum*) setting — pAJ43 (Gene [ 39 ] and 281 (1985)) etc. — a plasmid vector is available and the promotor and terminator which are used with *Escherichia coli* are available as it is as a promotor and a terminator.

[0029] In *Corynebacterium*, especially *Corynebacterium guru TAMIKAMU* (*Corynebacterium glutamicum*), the plasmid vector (Mol.Gen.Genet.196 and 175) (1984) of pCS11 (JP,57-183799,A), pCB101, etc. is available.

[0030] In a streptococcus (*Streptococcus*) group, pHV1301 (FEMS Microbiol.Lett.26 and 239 (1985)), pGK1 (Appl.Environ.Microbiol.50 and 94 (1985)), etc. are available as a plasmid vector.

[0031] *Lactobacillus* (*Lactobacillus*) In the group, it was developed for streptococcus groups. pAMBeta1 etc. is available (J. Bacteriol.137 and 614) (1979), and the \*\*\*\*\* thing used with *Escherichia coli* as a promotor is available.

[0032] *Saccharomyces* (*Saccharomyces*) A group, especially *Saccharomyces SEREBIJIAE* (*Saccharomyces cerevisiae*) It sets and is YRp. A system and YEp A system and YCp A system and YIp A system plasmid is available, and since the integration vectors (EP 537456 etc.) using the homologous recombination by the ribosomal DNA which recognizes multi-copy existence into a chromosome can introduce a gene by many copies and can hold a gene to stability, they are very useful. Moreover, ADH (alcoholic dehydrogenase), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), PHO (acid phosphatase), GAL (the promotor of gamma-galactosidase, PGK (phosphoglycerate kinase), ENO (enolase), etc. and a terminator are available, and it is \*\*.)

[0033] In the Clive ROMAISESU group, especially Clive ROMAISESU RAKUTISU (*Kluyveromyceslactis*) *Saccharomyces SEREBIJIAE* origin 2 micrometers A system plasmid and pKD1 System plasmid (J. Bacteriol.145 and 382-390 (1981)), It participates in killer activity. pGK11 Origin plasmid, Autonomous replication gene KARS in the Clive ROMAISESU group By homologous recombination by the system plasmid, ribosomal DNA, etc. The vector plasmids (EP 537456 etc.) which can be integrated in a chromosome are available. moreover, ADH and PGK etc. — the originating promotor and terminator are available.

[0034] *Schizosaccharomyces* (*Schizosaccharomyces*) It sets to a group and is the *Schizosaccharomyces POMBE* origin. ARS (gene which participates in autonomous replication) And a plasmid vector including the selective marker which carries out the complementation of the auxotroph of the *Saccharomyces SEREBIJIAE* origin is available (Mol.Cell.Biol.6 and 80 (1986)). Moreover, the *Schizosaccharomyces POMBE* origin ADH A promotor etc. can use (EMBO J.6 and 729 (1987)).

[0035] CHIGOSAKKAROMAISESU group (*Zygosaccharomyces*) It sets. CHIGOSAKKAROMAISESU ROUKISHI (*Zygosaccharomyces rouxii*) Origin The plasmid vector originating in pSB3 (1985) (Nucleic Acids Res.13 and 4267) etc. is available. *Saccharomyces cervisiae* origin PHO5 A promotor, CHIGOSAKKAROMAISESU ROUKISHI origin GAP-Zr (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) A promotor (Agri.Biol.Chem.54 and 2521 (1990)) etc. is available.

[0036] *Hansenula* (*Hansenula*) In the group, the host-vector system is developed in *Hansenula poly MORUFA* (*Hansenulapolyomorpha*). Although the gene (HARS1, HARS2) which participates in the *Hansenula poly MORUFA* origin autonomous replication is also available as a vector, since it is comparatively unstable, the multi-copy integration to a chromosome is effective (Yeast 7 and 431-443 (1991)). Moreover, it is guided with a methanol etc. AOX (alcohol oxidase) and FDH (formic-acid dehydrogenase) A promotor etc. is available.

[0037] the *Pichia* (*Pichia*) group — setting — *Pichia pastoris* (*Pichia pastoris*) etc. — gene which participates in the *Pichia* origin autonomous replication (PARS1, PARS2) etc. — the used host-vector system is developed (Mol.Cell.Biol.5 and 3376 (1985)), and it can guide with high concentration culture and a methanol AOX etc. — a strong promotor can use (Nucleic Acids Res.15 and 3859 (1987)).

[0038] *Candida* (*Candida*) In the group, the host-vector system is developed in *Candida mull TOSA* (*Candida maltosa*), the *Candida albicans* (*Candida albicans*), *Candida tropicalis* (*Candida tropicalis*), etc. In *Candida mull TOSA*, cloning of the *Candida mull TOSA* origin ARS is carried out (Agri.Biol.Chem.51, 51, and 1587 (1987)), and the vector using this is developed.

[0039] *Aspergillus* (*Aspergillus*) In a group, it most often in mold inquires, the integration to a plasmid or a chromosome is available, and the protease outside a fungus body and the promotor of the amylase origin are available (Trends in Biotechnology 7 and 283-287 (1989)).

[0040] *Trichoderma* (*Trichoderma*) In a group, the host vector system using *Trichoderma RIZEI* (*Trichoderma reesei*) is developed, and the cellulase gene origin promotor outside a fungus body etc. can use (Biotechnology 7 and 596-603 (1989)).

[0041] The enzyme of this invention is *Candida* (*Candida*). It can manufacture by cultivating the gene recombination object to which the gene which carries out the code of the microorganism which produces the enzyme which has the property shown in \*\* from the following \*\* belonging to a group, its variant, or this enzyme was introduced into the microorganism host of a different kind, and this enzyme productivity was given etc.

[0042] \*\* Operation NAD+ It considers as a coenzyme, alcohol is oxidized and a ketone or an aldehyde is generated.

Moreover, a ketone or an aldehyde is returned by using NADH as a coenzyme, and alcohol is generated.

[0043] \*\* Consider as the substrate of oxidation reaction of fatty alcohol including substrate specificity aromatic substitution. As compared with the 1st class alcohol, activity is high to the 2nd class alcohol. It oxidizes preferentially S 2-butanol ].

[0044] Let an aliphatic series ketone including an aldehyde or aromatic substitution be the substrate of a reduction reaction.

[0045] \*\* It is about 40,000 when it measures by molecular weight SDS-PAGE.

[0046] Furthermore, the microorganism (a variant and a gene recombination microorganism are included) containing the 2nd class alcoholic dehydrogenase or this enzyme of this invention or its processing object The 2nd class alcohol of aliphatic series which may be permuted by aromatic series, for example, 2-butanol, 2-octanol, phenyl ethanol, 1,3-butanediol, It is made to act on racemic-modification alcohol, such as beta-hydroxy-n-butanoic acid ethyl ester. When an optical isomer oxidizes only on the other hand (it sets to 2-butanol, 2-octanol, phenyl ethanol, 1,3-butanediol, and beta-hydroxy-n-butanoic acid ethyl ester, and they are the S bodies) The optical-activity alcohol (it sets to 2-butanol, 2-octanol, phenyl ethanol, 1,3-butanediol, and beta-hydroxy-n-butanoic acid ethyl ester, and they are the R bodies) of another side is producible. It is coenzyme NAD+ by this oxidation reaction. It is returned and NADH generates.

[0047] Generated NADH is NADH which a microorganism has NAD+ By the capacity to change, it is NAD+. It is convertible (playback). Moreover, they are NADH(s), such as glutamic dehydrogenase, glucose dehydrogenase, NADH dehydrogenase, and NADH oxidase, NAD+ It is NAD+ by adding the microorganism containing the enzyme which has the activity which oxidizes, or these enzymes, or its processing object to the system of reaction. It is also reproducible. Moreover, it is NAD+ with one kind of enzyme using the substrate specificity of the enzyme of this invention by making the substrate of the reduction reaction of these cheap enzymes, such as an acetone and 2-butanone, live together in the system of reaction. Playback can also be performed to coincidence.

[0048] Moreover, the microorganism (a variant and a transformation microorganism are included) which produces the 2nd class alcoholic dehydrogenase or this enzyme of this invention, or its processing object can be made to be able to act on the ketone body, and optical activity alcohol can be produced. For example, (S)-beta-hydroxy-n-butanoic acid ester etc. is producible from (S)-2-butanol from 2-butanone, the (S)-2-octanol from 2-octanone, the (S)-1-phenyl ethanol from an acetophenone, (S)-1,3-butanediol from 4-hydroxy-2-butanone, and acetoacetic ester. Coenzyme NADH oxidizes by this reduction reaction, and it is NAD+. It generates.

[0049] Generated NAD+ For example, NAD+ which a microorganism has It is convertible for NADH with the capacity changed into NADH (playback). This NAD+ Reduction activity can be promoted by adding a glucose, ethanol, a formic acid, etc. to the system of reaction. Moreover, they are NAD+, such as formic-acid dehydrogenase, a malate dehydrogenase, and glucose dehydrogenase, to the system of reaction. It is NAD+ by adding the microorganism containing the enzyme which has the capacity returned to NADH, or these enzymes, or its processing object. It can also return. Moreover, one kind of enzyme can also perform the regenerative reaction of NADH to coincidence using the substrate specificity of the enzyme of this invention by adding substrates of oxidation reaction, such as isopropanol and ethanol, to the system of reaction.

[0050]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention in more detail, this invention is not limited to this.

[0051] [Example 1] (purification of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

Candida PARAPUSHIROSHISU IFO 1396 The stock was cultivated by YM culture medium (glucose 10g, bacto peptone 5g, 3g of yeast extracts, malt extract 3g/L, pH6.0), and the fungus body was prepared according to centrifugal separation.

[0052] Extra-high voltage cell shredding equipment removed obtained \*\*\*\*\*, centrifugal separation removed fungus body residue after crushing a fungus body, and the cell-free extract was obtained. The protamine sulfuric acid was added to this cell-free extract, and a nucleic acid and microsome were removed. The fractions which added the ammonium sulfate to the supernatant liquid obtained according to centrifugal separation, and precipitated in saturation to it 70% were collected. Furthermore, the anion exchange chromatography using Q-sepharose FF was performed, concentration gradient elution of a sodium chloride was performed, and the peaks which have the 2nd class alcoholic dehydrogenase activity were collected. It added to the phenyl-sepharose which equilibrated the obtained fraction with the buffer solution containing 1.62M ammonium sulfate, and the canal chromatography was performed.

Ammonium-sulfate concentration was decreased to 0M, and the 2nd class alcoholic dehydrogenase activity fractions were collected (the measuring method of enzyme activity was performed by the above-mentioned approach). This activity fraction was added to the affinity column of red-sepharose, the bypassing fraction was added in the gel-filtration column of Superdex 200, and the gel filtration was performed. Activity fractions were collected, it added in mono-Q columns, the anion-exchange chromatography was performed using the concentration gradient of a sodium chloride, purity assay was performed for the activity fraction by SDS-PAGE, and only the fractions which show a single band were collected.

[0053] In polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE), as for the obtained 2nd class alcoholic dehydrogenase preparation, a band major [ one ] and several approaching thin bands were seen. It was a single band, as a result of all bands' having the 2nd class alcoholic dehydrogenase activity and analyzing this enzyme preparation by SDS-PAGE as a result of activity staining.

[0054] The molecular weight of the band in SDS-PAGE was about 40000 ( drawing 1 ).

[0055] Although the epitome of purification was shown in Table 1, the specific activity of a purification enzyme was 1370U/mg-protein.

[0056]

[Table 1]

	容量 (mL)	総蛋白量 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
粗抽出液	4800	157000	40100	0.255	100.0
プロタミン硫酸	5200	94600	35200	0.371	87.6
0-70% 飽和アンモニウム硫酸	550	78700	30700	0.390	76.5
Q-セファロース FF	550	8870	9730	1.10	24.2
フェニルセファロース	22	191	5440	28.5	13.6
セファロース 6B	2.4	22.1	6150	279	15.3
スルホセファロース 200	5.34	3.7	3140	846	7.8
モノ Q	1.05	1.7	2360	1370	5.9

[Example 2] (optimal pH of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

The 2nd class alcoholic dehydrogenase A potassium-phosphate buffer solution (KPB), the tris-hydrochloric-acid buffer solution (Tris-HCl), pH is changed using Britton-Robinson buffer solution. The oxidation activity of (S)-2-butanol, The reduction activity (what replaced NAD<sup>+</sup> with NADH (0.4 μmol), measured it the condition at the time of (S)-2-butanol oxidation activity measurement, and measured reduction with an absorbance [ accompanying reduction in NADH ] of 340nm of 2-butanone was measured. The maximum activity was expressed with the relative activity set to 100, and it was shown in drawing 2 and drawing 3. (S)-2-butanol oxidation reaction was [ 8.5-9.5, and the reduction reaction of 2-butanone of the optimal pH of a reaction ] 5.5-6.5.

[0057] [Example 3] (operation optimum temperature of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

It was shown in Table 2 which only temperature was changed and measured the 2nd class alcoholic dehydrogenase activity among standard reaction conditions. Optimum temperature was 50 degrees C.

[0058]

[Table 2]

温度 (°C)	30	37	45	50	55	60
相対活性 (%)	55	65	92	100	88	0

[Example 4] (pH stability of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

The residual activity after 30 degrees C and the processing during 30 minutes was measured in the tris-hydrochloric-acid buffer solution pH 8.0-9.0 and Britton-Robinson-buffer-solution pH 5.0-12.0, and it was shown in drawing 4. In pH 8.0-10.0, it was the most stable.

[0059] [Example 5] (thermal resistance of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

After leaving the 2nd class alcoholic dehydrogenase for 10 minutes by pH8.0, residual activity was measured and it was shown in drawing 5. It had 90% or more of residual activity also after 40 degrees C and heat treatment for 10 minutes.

[0060] [Example 6] (substrate specificity of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

The 2nd class alcoholic dehydrogenase is reacted with various alcohol and an aldehyde, and it is the activity of the oxidization and a reduction reaction. It expressed with the relative activity which set oxidization of (S)-2-butanol, and reduction of 2-butanone to 100, respectively, and was shown in Table 3 and 4.

[0061]

[Table 3]



	基 質	基質濃度 (mM)	補酵素	相対活性
酸 化 反 応	2-プロパノール	100	NAD <sup>+</sup>	60.0
	(S)-2-ブタノール	50	NAD <sup>+</sup>	100.0
	(R)-2-ブタノール	50	NAD <sup>+</sup>	3.3
	(RS)-2-ブタノール	100	NAD <sup>+</sup>	43.5
	2-ペンタノール	100	NAD <sup>+</sup>	34.0
	3-ペンタノール	100	NAD <sup>+</sup>	10.4
	2-ヘキサノール	50	NAD <sup>+</sup>	27.7
	(S)-2-オクタノール	5	NAD <sup>+</sup>	67.7
	(R)-2-オクタノール	5	NAD <sup>+</sup>	0.0
	(RS)-2-オクタノール	5	NAD <sup>+</sup>	39.2
酸 化 反 応	シクロヘキサノール	20	NAD <sup>+</sup>	52.8
	(S)-1-7-ヒドロキシノール	50	NAD <sup>+</sup>	89.3
	(R)-1-7-ヒドロキシノール	50	NAD <sup>+</sup>	1.1
	(S)-1,3-ブタジオール	50	NAD <sup>+</sup>	17.8
	(R)-1,3-ブタジオール	50	NAD <sup>+</sup>	0.3
	2,4-ペンタンジオール	100	NAD <sup>+</sup>	42.6
	(2R,4R)-2,4-ペンタンジオール	50	NAD <sup>+</sup>	0.1
	4-ヒドロキシ-2-ペンタノール	20	NAD <sup>+</sup>	40.8
	(S)-1-7-ヒドロキシ-2-ブタノール	50	NAD <sup>+</sup>	3.2
	(R)-1-7-ヒドロキシ-2-ブタノール	50	NAD <sup>+</sup>	7.9

[Table 4]

	基 質	基質濃度 (mM)	補酵素	相対活性
酸 化 反 応	(RS)-2-ヒドロキシノール	100	NAD <sup>+</sup>	0.3
	メタノール	100	NAD <sup>+</sup>	0.2
	エタノール	100	NAD <sup>+</sup>	1.0
	アリルアルコール	100	NAD <sup>+</sup>	2.4
	1-プロパノール	100	NAD <sup>+</sup>	1.5
	1-ブタノール	100	NAD <sup>+</sup>	2.3
	1-ペンタノール	100	NAD <sup>+</sup>	1.2
	(S)-1,2-プロパジオール	50	NAD <sup>+</sup>	2.5
	(R)-1,2-プロパジオール	50	NAD <sup>+</sup>	2.0
	2-ブタノン	100	NADH	100.0
還 元 反 応	アセトン	100	NADH	123.4
	アセトフェノン	20	NADH	121.8
	プロピオンアルデヒド	100	NADH	76.2
	4-ヒドロキシ-2-ブタノン	100	NADH	41.2
	3-ヒドロキシ-3-ヒドロキシ-2-ブタノン	100	NADH	18.5

[Example 7] (behavior to the inhibitor of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

30 degrees C of the 2nd class alcoholic dehydrogenase were processed for 30 minutes in various reagents, and the activity after processing was expressed with the residual activity which set unsettled activity to 100, and was shown in Table 5.

[0062]

[Table 5]

阻害剤	濃度 (mM)	相対活性
フェニルメルカプトエタノール	1	69.0
パラクロロ水銀安息香酸	0.05	0.0
N-メチルマレイミド	1	21.2
ヨード酢酸	1	52.0
エチレンジアミン四酢酸	1	102.5
o-フェナントロリン	1	19.0
HgCl <sub>2</sub>	1	0.0
CuSO <sub>4</sub>	1	25.5
ZnCl <sub>2</sub>	1	16.4
ジチオスレイトール	1	0.0
β-メルカプトエタノール	1	3.2
NH <sub>2</sub> OH	0.01	92.7
NaN <sub>3</sub>	0.02(%)	89.9
クロトン酸	50	89.6

Enzyme activity was notably checked by dithiothreitol (DTT), an iodoacetamide, the Parakou Rollo mercury benzoic acid, a mercury chloride, a zinc chloride, high-concentration metal KIRETA, and 2-mercaptoethanol.

[0063] [Example 8] (analysis of the partial amino acid sequence of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

The refined 2nd class alcoholic dehydrogenase 0.153mg 50mM Tris-hydrochloric acid pH 9.0, 4M It is under [ urea ] setting, 0.53 mug 30 degrees C was digested by RIJIRU proteinase for 6 hours. It is Opposition HPLC (TOSOH make TSK ODS-120T column) about the cut peptide fragment. It uses and is 0.1%. The gradient elution of the acetonitrile in trifluoroacetic acid separated, and it isolated preparatively.

[0064] Protein sequencer 477made from ABI A determined the amino acid sequence for the peptide isolated preparatively.

[0065] The underline showed the amino acid sequence determined by the protein sequencer to drawing 6 and the amino acid sequence of 7 and 8.

[0066] [Example 9] (PCR cloning of the gene which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

The DNA array expected from the amino acid sequence of the part near the amino terminal of the 2nd class alcoholic dehydrogenase is compounded in consideration of degeneracy, and it is a mixed PCR primer (CpN). It carried out. Moreover, it is another mixed PCR primer (CpT10) about the complementary array of the DNA array expected from the amino acid sequence of the part near a C terminal. It compounded by carrying out. These arrays were shown in drawing 9. In addition, DNA synthesizer 381made from ABI A performed composition of DNA.

[0067] [Example 10] (preparation of the chromosome DNA from Candida PARAPUSHIROSHISU)

Candida PARAPUSHIROSHISU IFO 1396 YEPD culture-medium (1% yeast extract, 2% poly peptone, 2% glucose) 100mL It cultivated in inside and centrifugal separation recovered the fungus body. Fungus body 25mL 1M A sorbitol and 0.1M It \*\*\*\*(ed) to ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifugal separation recovered the fungus body again. Collected fungus body 10mL 50mM Potassium phosphate buffer solution pH 7.5, 1M A sorbitol and 0.1M 2 - It suspends in mercaptoethanol and is 2.5 mg/mL further. They are 0.4mL(s) about a zymolyase. It added and the protoplast was formed by incubating at 30 degrees C. The speculum recovered the protoplast formation check-back and centrifugal separation recovered the fungus body. About the collected fungus body, it is 12mL 50mM Tris-hydrochloric acid pH 7.4 and 20mM EDTA It \*\*\*\* and is 1.2mL further. It mixed with the sufficient SDS (sodium dodecyl sulfate) addition-back 10%. 3.6mL after 65 degrees C incubates for 30 minutes in this condition 5M Potassium acetate pH5.0 It added, and was left for 60 minutes in Hikami, and denaturation precipitate of the protein was carried out.

[0068] Centrifugal separation separated denatured protein, equivalent isopropanol was added at the room temperature after collecting supernatant liquid, and it mixed slowly. DNA which precipitated according to centrifugal separation is collected, and they are after desiccation and 15mL 10mM Tris-hydrochloric-acid buffer solution pH 7.4, 1mM EDTA It dissolves and is 1 mg/mL RNase (RNase) 0.75mL. It adds and is 37 degrees C and 1. Time amount incubation was carried out and RNA with which are contaminated was decomposed. After RNA decomposition, after performing a phenol extract, a phenol/chloroform extraction, and a chloroform extraction, ethanol precipitate recovered DNA and it considered as the template DNA of the PCR reaction in an example 11.

[0069] [Example 11] (cloning by the PCR method of the 2nd class alcoholic dehydrogenase gene)

Two kinds of mixed PCR primer (CpN and CpT10) 100pmol(s) compounded in the example 9 In an example 10 The prepared Candida PARAPUSHIROSHISU chromosome DNA 50ng(s) The included buffer solution for PCR (10mM tris-hydrochloric-acid buffer-solution pH 8.3, 50mM potassium chloride, 1.5mM magnesium chloride, \*\* 0.2mM dNTP, and 0.01% gelatin and 2U TaqDNA polymerase (Roche A.G. make)) is prepared. Magnification DNA was checked for thermal denaturation (94 degrees C, 30 seconds), annealing (45 degrees C, 30 seconds), and an expanding reaction (a part for 60 degrees C and 2) by agarose gel electrophoresis after cooling to 30 cycle deed and 4 \*\*.

[0070] [Example 12] (subcloning of DNA amplified by the PCR method)

DNA amplified by the PCR method in the example 11 SureClone LigationKit (Pharmacia manufacture) pUC18 As a result of carrying out subcloning and DNA sequencer 373made from ABI A's determining the base sequence, an PCR primer array is included. It consisted of 971 bases. The array is a primer among drawing 6 and DNA shown in 7 and 8. CpN And CpT10 It is the part which hits in between. This array is henceforth described as a "core array."

[0071] [Example 13] (cloning of the core array circumference array by the reverse PCR method)

5' of a core array - Complementary array CAATTGACCCGCTTTGGGC (CPA-MUN) of a part near a side, and 3' - Array of the part near a side TTCGAATCTTGGGATGTTTTTG (CPA-NSP) Chemosynthesis was carried out. The location of the compound reverse PCR primer in DNA which carries out the code of the 2nd class alcoholic

dehydrogenase was shown in drawing 6, and 7 and 8.

[0072] As DNA mold of reverse PCR, it is a restriction enzyme about the chromosome DNA of Candida PARAPUSHIROSHISU first. HaeII It digested and self-cyclization of the digest was carried out using T4 DNA ligase. This self-ring ghost 50ng, primer which carried out chemosynthesis CPA-MUN And CPA-NSP Respectively 20pmol The cycle of thermal denaturation (94 degrees C, 30 seconds), annealing (50 degrees C, 30 seconds), and an expanding reaction (a part for 70 degrees C and 2) was performed 30 times using the included buffer solution for PCR (thing given in an example 11). They are an example 12 and this appearance about the amplified DNA fragment. SureClone Ligation Kit (Pharmacia manufacture) is used. pUC18 Subcloning was carried out and DNA sequencer 373made from ABI A determined all base sequences.

[0073] The amino acid sequence in which all the base sequences of DNA and this DNA which carry out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase obtained by PCR and reverse PCR carry out a code was summarized to drawing 6, and 7 and 8.

[0074] [Example 14] (composition using the PCR method of the gene which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

First, the restriction enzyme part was introduced by the PCR method using the primer. an example — ten — setting — having obtained — DNA — mold — \*\* — carrying out — a primer — \*\*\*\*\* — EcoRI — a restriction enzyme — a part — containing — five — ' — a primer — " — CPA-ATG — " (5'-TCGCGAATTC AATGTCAATTCCATCAAGCCAG-3') — BglIII — a part — containing — three — ' — a primer — " — CPA-TAG — " (5'-AGATCTTACTATGGATTA AAAACA AACTCTA-3') — the DNA fragment of about 1030 bp(s) — the PCR method — amplifying — a gene fragment — having obtained . DNA synthesizer by ABI company 381A performed composition of DNA, and the PCR reaction was performed like the example 11.

[0075] [Example 15] (subcloning of DNA amplified by the PCR method)

PCR fragment amplified by the example 14 It connected with the SmaI part of a plasmid pUC18 multi-cloning site in SureClone Ligation Kit (Pharmacia manufacture) ( drawing 10 ). The built plasmid (pCPA6R) was inserted in the reverse sense with the lactose promoter (contained in the part shown by "lacZ" among drawing).

[0076] [Example 16] (construction of the 2nd class alcoholic dehydrogenase gene expression plasmid pKK-CPA1)

Furthermore, subcloning of the 2nd class alcoholic dehydrogenase was carried out to the expression vector pKK 223-3 (product made from FARUMASHII), and pKK-CPA1 was built. The construction approach of pKK-CPA1 is as follows. The 2nd class alcoholic dehydrogenase gene expression vector pKK-CPA1 was built by extracting the fragment which has the 2nd class alcoholic dehydrogenase after cutting by EcoRI (TAKARA Co., Ltd. make) and HindIII (TAKARA Co., Ltd. make), after carrying out EcoRI (pro megger company make) digestion of the pCPA6R and connecting a HindIII linker (TAKARA Co., Ltd. make), and connecting with what cut the expression vector pKK 223-3 with restriction enzymes EcoRI and HindIII ( drawing 11 ).

[0077] [Example 17] (production of the 2nd class alcoholic dehydrogenase)

ISHIERIHIA KORI JM 109 (Escherichia coli) The 2nd class alcoholic dehydrogenase production strain was created by preparing a competent cel and carrying out a transformation by expression vector pKK-CPA1. 30 degrees C of this strain were cultivated for 3 hours in LB culture medium (1.0% poly peptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, pH7.2) which added ampicillin by the concentration of 0.1mg/ml. Isopropyl thiogalactoside (IPTG) was added and it cultivated for further 5 hours so that it might be set to last concentration 1mM, and centrifugal separation of the culture medium was carried out, and it carried out the harvest.

[0078] [Example 18] (activity evaluation by the enzyme reaction)

Fungus body prepared according to the example 17 50 mM Tris-HCl pH9.0, 0.01%2 - It suspended in mercaptoethanol, and ultrasonic grinding was carried out and the crude enzyme solution was obtained. this enzyme liquid 50mm The tris hydrochloric-acid buffer solution pH9.0, 50mM(S)-1,3-butanediol, and 2.5mM NAD+ from — the 30-degree C reaction mixture which changes — adding — NAD+ 340nm accompanying an increment (S)-1,3-butanediol oxidation activity was measured by measuring an absorbance. A result is shown in Table 6. In addition, the result performed like the example 18 as contrast using host ISHIERIHIA KORI which has not carried out a transformation by manifestation plasmid pKK-CPA1 is shown in Table 6 at coincidence.

[0079]

[Table 6]

菌株名	比活性(Unit/mg)
イシェリヒア・コリ JM109 (pKK-CPA1)	0.581
イシェリヒア・コリ JM109	0.0

[Example 19] (production of (R)-1,3-butanediol by the gene recombination fungus body)

Calcium-carbonate water was added 0.8% with racemic 1,3-butanediol so that it might become the fungus body prepared according to the example 17 with the 5% of the last concentration, and the shaking reaction was carried out by 30 degrees C and 250rpm with the diameter test tube of 21mm for 17 hours. In addition, it is 660nm about the cell mass concentration at the time of reaction initiation. It was made for OD which can be set to be set to 20. 2ml of ethyl acetate after disinfecting in centrifugal separation after reaction termination and saturating 500micro of obtained supernatant liquor I with a sodium chloride It used and the 1,3-butanediol which remains was extracted. It is an acetyl chloride 100 to the residue after deliquoring an extract. mul was added and acetylated. The 1,3-butanediol which added and acetylated the 1ml n-hexane to this was dissolved, and optical purity was measured with the high performance chromatography (column:Chiralcel alumnus (Daicel Chemical Industries, Ltd. make), and a solvent:n-hexane / 2-propanol = 19:1, wavelength [ of 220nm ], and 1.0ml [ of the rates of flow ] temperature) using an optical-resolution column (holding time: (S) object 15 minutes, and (R) object 19.3 minutes). [ [a part for /and temperature of 40 degrees C] ] Moreover, after diluting previous supernatant liquor with aqua destillata suitably, the quantum of the 1,3-butanediol concentration was carried out with the gas chromatography [column:Thermon 3000 5% / chromosorb W 80 -100 mesh

(bore 3mm x die length of 2.1m) (Nobukazu chemically-modified incorporated company make), and temperature 130 \*\*]. The optical purity of the obtained 1,3-butanediol and yield are shown in Table 7. In addition, the result performed like the example 19 as contrast using host ISHIERIA KORI which has not carried out a transformation by manifestation plasmid pKK-CPA1 is shown in Table 7 at coincidence. In addition, yield expresses "the mole ratio of the 1,3-butanediol which remained after reaction termination to the racemic 1,3-butanediol added first" all over Table 7.

[0080]

[Table 7]

菌株名	光学純度(%)	収率(%)
イシエリヒア・コリ JM109 (pKK-CPA1)	99.2	48.3
イシエリヒア・コリ JM109	0.0	88.8

[0081]

[Effect of the Invention] It became possible to obtain the microorganism in which the transformation was carried out by DNA which carries out the code of the new 2nd class alcoholic dehydrogenase which has stereospecificity, and this enzyme by this invention, and DNA which carries out the code of this enzyme.

[0082] By using the microorganism (a variant and a transformation microorganism being included) which produces this enzyme or this enzyme, or its processing object, it became possible to perform efficiently manufacture of the optical-activity alcohol from racemic-modification alcohol, manufacture of the optical-activity alcohol from an unsymmetrical ketone, etc.

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the pattern in the sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of the refined 2nd class alcoholic dehydrogenase.

[Drawing 2] It is drawing showing the pH dependency of (S)-2-butanol oxidation reaction of the 2nd class alcoholic dehydrogenase in the relative activity which set optimal pH to 100.

[Drawing 3] It is drawing showing activity [ in / for the pH dependency of the 2-butanone reduction reaction of the 2nd class alcoholic dehydrogenase / optimal pH ] in the relative activity set to 100.

[Drawing 4] It is drawing showing the residual activity after processing 30 degrees C of the 2nd class alcoholic dehydrogenase in each pH for 30 minutes.

[Drawing 5] It is drawing showing the residual activity after processing the 2nd class alcoholic dehydrogenase at each temperature for 10 minutes.

[Drawing 6] It is drawing showing the part of the base sequence of DNA which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase, the amino acid sequence expected from this base sequence, an PCR primer, and a reverse PCR primer.

[Drawing 7] It is drawing showing the part of the base sequence of DNA which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase, the amino acid sequence expected from this base sequence, an PCR primer, and a reverse PCR primer.

[Drawing 8] It is drawing showing the part of the base sequence of DNA which carries out the code of the 2nd class alcoholic dehydrogenase, the amino acid sequence expected from this base sequence, an PCR primer, and a reverse PCR primer.

[Drawing 9] It is drawing showing the structure of the mixed primers CpN and CpT10 for PCR. In addition, that two or more bases are indicated to be to the same-among drawing part shows that the mixed primer is the mixture of the primer which has the base of these plurality.

[Drawing 10] It is drawing showing the configuration of plasmid pCPA6R.

[Drawing 11] It is drawing showing the configuration of expression vector pKK-CPA1.

---

[Translation done.]

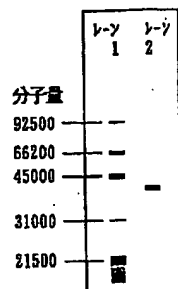
\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

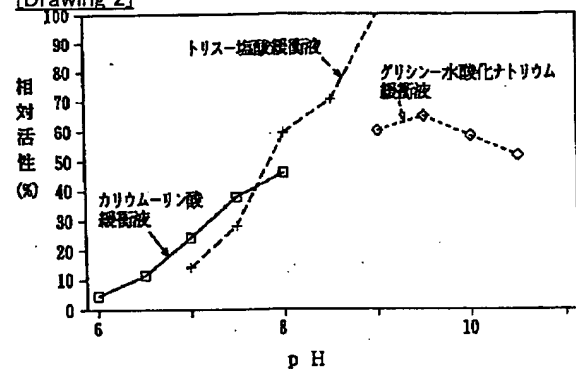
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

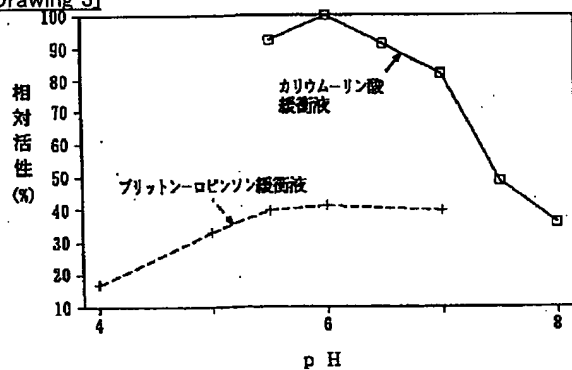
[Drawing 1]



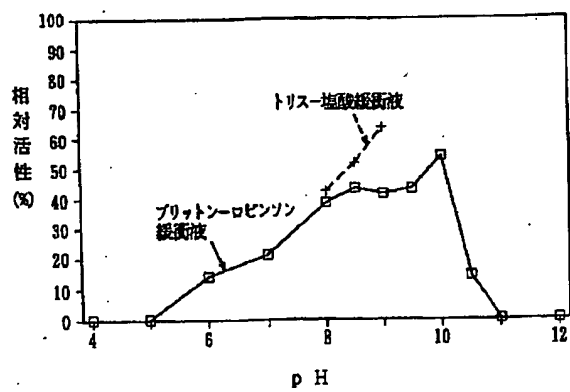
[Drawing 2]



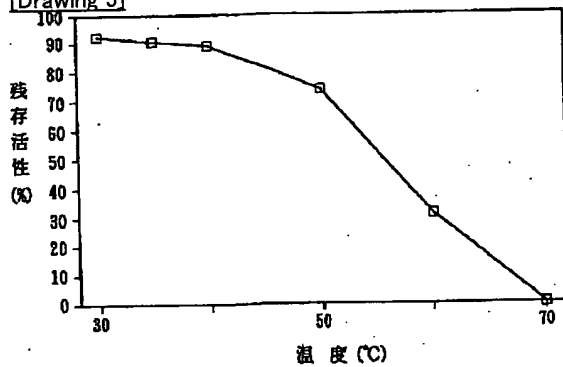
[Drawing 3]



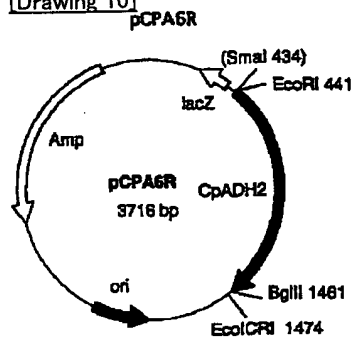
[Drawing 4]



[Drawing 5]



[Drawing 10]



[Drawing 6]

# 2級アルコール脱水素酵素をコードするDNA

10 20 30 40 50 60  
 ATGTCATTCCATCAAGCCAGTACGGATTEGTATTCAATAAGCAATCAGGACTTAATCTG  
MetSerIleProSerSerGlnTyrGlyPheValPheAsnLysGlnSerGlyLeuAsnLeu

CpN →

70 80 90 100 110 120  
 AGAAATGATTTGCCTGTCCACAAGCCAAAGCGGGTCAATTGTTGTTGAAAGTTGATGCT  
ArgAsnAspLeuProValHisLysProLysAlaGlyGlnLeuLeuLeuLysValAspAla

← CPA-MUN

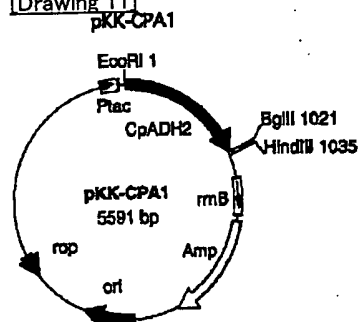
130 140 150 160 170 180  
 GTTGGATTGTGTCATTCTGATTACATGTCATTACGAAGGGTTGGATTGTGGTGATAAT  
ValGlyLeuCysHisSerAspLeuHisValIleTyrGluGlyLeuAspCysGlyAspAsn

190 200 210 220 230 240  
 TATGTCATGGACATGAAATTGCTGGAAGTGTGCTGCTGCGGTGATGATGTCATTAAAC  
TyrValMetGlyHisGluIleAlaGlyThrValAlaAlaValGlyAspAspValIleAsn

250 260 270 280 290 300  
 TACAAGCTTGGTGATCGTGTGCCCTGTGTCGGACCCAATGGATGTGGTGGGTGCAAGTAT  
TyrLysValGlyAspArgValAlaCysValGlyProAsnGlyCysGlyGlyCysLysTyr

310 320 330 340 350 360  
 TGTCTGGTGCCATTGACAATGTATCTAAAAACGCATTTGGTGATTGCTTCGGATTGCGG  
CysArgGlyAlaIleAspAsnValCysLysAsnAlaPheGlyAspTrpPheGlyLeuGly

[Drawing 11]



[Drawing 7]



370 380 390 400 410 420  
TACGATGGTGGGTATCAACACTACTTGTGGTTACTAGACCACGTAAGTTGTCTCGTATC  
TyrAspGlyGlyTyrGlnGlnTyrLeuLeuValThrArgProArgAsnLeuSerArgIle

430 440 450 460 470 480  
CCAGATAACGTATCTGCAGACGTGGCTGCGGCTTCAACTGATGCTGTATTGACACCATAT  
ProAspAsnValSerAlaAspValAlaAlaAlaSerThrAspAlaValLeuThrProTyr

490 500 510 520 530 540  
CACGCAATCAAGATGGCTCAAGTGTCAACCACTTCAATATCTTGCTTATTGGTGGTGGT  
HisAlaIleLysMetAlaGlnValSerProThrSerAsnIleLeuLeuIleGlyAlaGly

550 560 570 580 590 600  
GGATTGGGTGGAAATGCAATTCAAGTTGCCAAGGCATTTGGTCCGAAAGTTACTGTTTTG  
GlyLeuGlyGlyAsnAlaIleGlnValAlaLysAlaPheGlyAlaLysValThrValLeu

610 620 630 640 650 660  
GACAAAAAAGGAGGCTCGTGACCAAGCAAAGAAGTTGGGTGCTGATGCAGTTTATGAA  
AspLysLysLysGluAlaArgAspGlnAlaLysLysLeuGlyAlaAspAlaValTyrGlu

670 680 690 700 710 720  
ACATTGCCAGAATCCATTTCTCCTGGCTCTTTTTCAGCATGTTTGGATTGTTTCAGTG  
ThrLeuProGluSerIleSerProGlySerPheSerAlaCysPheAspPheValSerVal

730 740 750 760 770 780  
CAAGCTACATTTGATGTATGTCAAAAGTATGTTGAACCAAAGGGTGTAAATTATGCCCGTG  
GlnAlaThrPheAspValCysGlnLysTyrValGluProLysGlyValIleMetProVal

[Drawing 8]

790 800 810 820 830 840  
 GGACTCGGTGCTCCTAATTTATCGTTTAATTTGGGAGATTTGGCATTGAGAGAAATTCGA  
 GlyLeuGlyAlaProAsnLeuSerPheAsnLeuGlyAspLeuAlaLeuArgGluIleArg

850 860 870 880 890 900  
 ATCTTGCGTAGTTTTTGGGGAAGTACTAATGATTTGGATGATGTTTTGAAATTGGTTAGT  
 IleLeuGlySerPheTrpGlyThrThrAsnAspLeuAspAspValLeuLysLeuValSer  
 CPA-NSP →

910 920 930 940 950 960  
 GAAGGTAAAGTTAAACCCGTTGTGAGAAGTGCCAAATTGAAGGAATTGCCAGAGTATATT  
 GluGlyLysValLysProValValArgSerAlaLysLeuLysGluLeuProGluTyrIle

970 980 990 1000 1010  
 GAAAAATTGAGAAACAATGCTTATGAAGGTAGAGTTGTTTTAATCCATAG  
 GluLysLeuArgAsnAsnAlaTyrGluGlyArgValValPheAsnPro\*\*\*

← CpT10

[Drawing 9]

混合プライマーCpN、CpT10の塩基配列

(CpN)

アミノ酸配列: Tyr-Gly-Phe-Val-Phe-Asn-Lys-Gln

DNA配列 : 5' TAT-GGT-TTT-GTT-TTT-AAT-AAA-CA 3'

(CpN)	C	C	C	C	C	C	G
	A		A				
	G		G				

(CpT10)

アミノ酸配列: Asn-Asn-Ala-Tyr-Glu-Gly-Arg

DNA配列 : 5' AAT-AAT-GCT-TAT-GAA-GGT-CG 3'

C	C	C	C	G	C	A
	A			A		
	G			G		

相補配列 : 3' TTA-TTA-CGA-ATA-CTT-CCA-GC 5'

(CpT10)	G	G	G	G	C	G	T
	T				T		
	C				C		

---

[Translation done.]